

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología



TESIS DOCTORAL

**Evolución, selección y detección de beta-lactamasas CTX-M con
espectro de acción templado**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Aida Ripoll González

Directores

Juan Carlos Galán Montemayor
Fernando Baquero Mochales

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología



**EVOLUCIÓN, SELECCIÓN Y DETECCIÓN DE
B-LACTAMASAS CTX-M CON ESPECTRO DE
ACCIÓN AMPLIADO**

Tesis doctoral presentada por

D^a Aida Ripoll González

para la obtención del grado de doctor

Bajo la dirección de los doctores

D. Juan Carlos Galán Montemayor

D. Fernando Baquero Mochales

Servicio de Microbiología.

Hospital Universitario Ramón y Cajal (IRYCIS)



Madrid, 2013

El Dr. D. Juan Carlos Galán Montemayor, Facultativo Especialista de Área y Responsable de la Unidad de Virología Molecular y el Dr. D. Fernando Baquero Mochales, Director Científico del IRYCIS, del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid,

CERTIFICAN QUE: Dña. **AIDA RIPOLL GONZÁLEZ** ha realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid bajo su dirección el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor con el título:

**EVOLUCIÓN, SELECCIÓN Y DETECCIÓN DE B-LACTAMASAS
CTX-M CON ESPECTRO DE ACCIÓN AMPLIADO**

Y para que así conste, firmamos la presente certificación en Madrid, 2013.

Fdo. Dr. Juan Carlos Galán Montemayor

Fdo. Dr. Fernando Baquero Mochales



EVOLUCIÓN, SELECCIÓN Y DETECCIÓN DE B-LACTAMASAS CTX-M CON ESPECTRO DE ACCIÓN AMPLIADO

Este trabajo fue financiado por:

- Unión Europea: Sexto y Séptimo Programa Marco en Investigación, Desarrollo Tecnológico y de Innovación:
 - EAR: LSHM-CT-2005-518152 (Effects of Antibiotic Resistance on Bacterial Fitness, Virulence and Transmission).
 - PAR: PAR-241476 (Predicting Antibiotic Resistance)..
- Ministerio de Economía y Competitividad. Instituto de Salud Carlos III:
 - FIS-PI-080624. Predicción de cómo el coste biológico afecta a la epidemicidad de las β -lactamasas tipo CTX-M, mediante el desarrollo de nuevas técnicas moleculares.



AGRADECIMIENTOS

Por fin ha llegado el momento. Las mejores cosas son las que se hacen esperar, sólo has de tener la paciencia suficiente.

Mi paso por el hospital constituye una de las etapas más especiales de mi vida, sobre todo porque he conocido a muchas personas de las que he aprendido muchas cosas y muchos valores que, a lo largo de esta andadura tan larga que es la vida, me ayudarán a afrontar los retos que se puedan plantear. Todos y cada uno de vosotros formáis parte de mi historia y quedará grabado para siempre en mi memoria.

En primer lugar, dar las gracias especialmente a mis directores, el Dr. Fernando Baquero y el Dr. Juan Carlos Galán, que desde el principio depositaron su confianza en mí y me dieron la oportunidad de desarrollarme profesionalmente mediante la realización de esta Tesis Doctoral.

Al Dr. Fernando Baquero por haberme acogido en su grupo de investigación, por dedicarme su valioso tiempo en los momentos que ha sido necesario, por compartir sus conocimientos para enseñarme y por su comprensividad cuando lo he necesitado.

Al Dr. Juan Carlos Galán por su contribución en mi formación, por haberme transmitido positividad sobre todo en los últimos momentos de la realización de esta Tesis y por su insistencia para que su contenido, parte por parte, saliera adelante y tomara sentido.

Al Dr. Rafael Cantón, que gracias a su implicación y ayuda, ha sido posible realizar una parte importante de esta Tesis Doctoral, que ha hecho que los resultados se hayan podido aplicar a la práctica clínica dando un toque especial a esta Tesis. Gracias por haberme dedicado tu tiempo, por estar siempre disponible, por reconocer mi esfuerzo y por aconsejarme en los momentos que he necesitado.

Al Dr. José Claudio Pérez-Díaz, que aunque no hemos trabajado directamente juntos, fuimos compañeros de laboratorio y siempre estuvo dispuesto a ayudar y a compartir sus conocimientos.

A la Dra. María Isabel Morosini, gracias por ser como eres y por echarme una mano cuando lo he necesitado. Siempre me has transmitido, una paz y tranquilidad que me han ayudado mucho.

A la Dra. Rosa del Campo, con quien desde el principio hubo una conexión especial, gracias por esa energía positiva que me has transmitido, por ayudarme siempre que lo he necesitado y por compartir conmigo tan buenos momentos.

A las Dras. Carmen Turrientes, Aránzazu Valverde y María García, gracias por estar siempre disponibles para cualquier cosa que necesitara y gracias por todos esos ratos que

hemos pasado juntas como compañeras y como amigas, habéis sido un apoyo muy importante para mí durante estos años y he aprendido muchas cosas buenas de vosotras. Una mención especial para Carmen, que por pertenecer al mismo grupo de trabajo, ha supuesto un gran refuerzo para mí.

A las Dras. Marta Tato, Elia Gómez y Patricia Ruiz, gracias por los buenos momentos que hemos pasado y por ayudarme y enseñarme siempre que me ha hecho falta.

Mi gratitud a mis compañeros y amigos: la Dra. Ângela Novais, que durante todos los años en los que hemos coincidido ha sido una gran ayuda y apoyo para mí; a Tania, a Ana Sofía y a Manu, gracias por todos los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio y por vuestro apoyo incondicional; a los más recién llegados Ricardo y los Dres. Irene Martín y Antonio Valenzuela, que aunque hace menos tiempo que nos conocemos, hemos compartido ya muchas cosas y las seguiremos compartiendo y, gracias Ana Moreno por tu amistad y por tu ayuda en todo momento.

A mi madre, gracias por todo, porque para llegar hasta aquí hay que dar muchos pasos y en todo momento has estado a mi lado apoyándome.

A David, el motor de mi vida, gracias por tu confianza ciega en mí. Contigo a mi lado este camino ha sido mucho más fácil.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1. El problema de la resistencia antibiótica a nivel global.....	1
1.1.- Origen de la resistencia antibiótica.....	1
1.2.- La cambiante epidemiología de la resistencia antibiótica.....	3
2. Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos.....	5
3. Clasificación de las β -lactamasas.....	6
4. Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).....	12
5. La emergencia de las β -lactamasas del tipo CTX-M.....	14
6. Evolución de las BLEE-CTX-M. Fuerzas de selección y diversificación.....	19
CAPÍTULO 1.....	24
Selección <i>in vitro</i> de variantes de <i>Escherichia coli</i> productores de CTX-M resistentes a la combinación de β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas (BLiBL).....	24
Introducción.....	25
1. Escenario actual del tratamiento de las infecciones por bacterias productoras de BLEE.....	25
2. Evolución de la resistencia antibiótica.....	26
3. Predicción de la resistencia antibiótica.....	27
Objetivo.....	36
Materiales y métodos.....	37
Resultados.....	41
Discusión.....	47
CAPÍTULO 2.....	52
Detección de variantes genéticas de las β -lactamasas CTX-M con fenotipos de resistencia a BLiBLs en <i>E. coli</i> : enmascaramiento con otros mecanismos de resistencia.....	52
Introducción.....	53
1. Controles de calidad para mejorar la detección de mecanismos de resistencias complejos a los antimicrobianos.....	54
2. Métodos básicos para el estudio <i>in vitro</i> de la sensibilidad a los antimicrobianos en los laboratorios de Microbiología Clínica.....	55
3. Interpretación del perfil de resistencias según los puntos de corte (<i>breakpoints</i>) establecidos por los diferentes comités.....	59
Objetivo.....	62
Materiales y métodos.....	63
Resultados.....	67

Discusión	83
CAPÍTULO 3	86
Farmacodinámica de la selección de <i>E. coli</i> productores de CTX-M con resistencia a BLiBLs: predicción de la respuesta clínica basada en estudios de cinética de muerte.	86
Introducción	87
1. Infecciones debidas a cepas productoras de BLEEs.	87
2. Elección del tratamiento en las infecciones por cepas productoras de BLEE.	87
3. Alternativas terapéuticas para el tratamiento de infecciones en que se sospechan β -lactamasas de espectro ampliado: posibles consecuencias.	88
Objetivo	90
Materiales y métodos	91
Resultados	96
Discusión	105
CONCLUSIONES GENERALES	110
BIBLIOGRAFÍA	112
ANEXOS	131
ABREVIATURAS	131
PUBLICACIONES	133
Artículos originales.	133
Manuscrito en preparación	133

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. El problema de la resistencia antibiótica a nivel global.

1.1.- Origen de la resistencia antibiótica.

Tanto los antibióticos como los genes de resistencia a antibióticos tienen un origen ancestral, encontrándose en el medio ambiente desde hace millones de años ^(5,27,69,255,267). Probablemente una de las demostraciones mas contundentes sobre el origen ancestral de la resistencia antibiótica fue aportada recientemente por D'Costa y *col*, cuando, analizando muestras de hielo del Pleistoceno en regiones de Alaska, fueron capaces de detectar determinantes genéticos de resistencia a ampicilina, tetraciclina o glicopéptidos ⁽⁶⁹⁾. El papel funcional de los determinantes de resistencia en bacterias productoras de antibióticos es protegerse a si mismas de la actividad nociva de sus propias moléculas; sin embargo, en bacterias no productoras, este papel biológico es menos evidente. Se ha sugerido que estos genes cumplen una función fisiológica (como la implicación de AmpC en el reciclado de la pared celular) como moléculas de señal para, en primera instancia, facilitar redes de interacciones entre los diferentes componentes o redes metabólicas de la bacteria o interacciones entre microorganismos ^(86,130). Hoy en día la comunidad científica esta comprendiendo que el problema de la resistencia antibiótica no es solo un problema mundial para la salud humana, tiene además una distribución global en la naturaleza, ya que antibióticos y genes de resistencia antibiótica han estado co-evolucionando durante millones de años ⁽²⁶⁸⁾.

Sin embargo, desde la producción industrial de antibióticos y después de su introducción en la clínica, se ha generado un excesivo consumo de estos compuestos en medicina, veterinaria y en agricultura, originando un incremento continuado de fracasos de la terapia antimicrobiana debido al aumento en número (por dispersión) y en diversidad (por cambios genéticos) de microorganismos resistentes a un amplio rango de antimicrobianos (por selección de los determinantes de resistencia de los antibióticos mas comúnmente utilizados). Estos procesos, junto a la contaminación del medio ambiente a través de las aguas residuales que transportan los compuestos antimicrobianos, han desembocado en una

dispersión global de los mecanismos de resistencia antibiótica con importancia clínica. En las zonas contaminadas, que coinciden con áreas urbanizadas o de alta población, donde la concentración de antibióticos es mayor ^(103,170,236,250), se ejerce una presión selectiva sobre el los ecosistemas microbianos ambientales, enriqueciendo la abundancia y diversidad de pre-genes y genes de resistencia. Estos genes constituyen el resistoma ^(70,90,146,222) y pueden distribuirse mediante el mobiloma (conjunto de todos los elementos genéticos capaces de movilizar el ADN entre los genomas y que incluyen plásmidos, elementos integrativos-conjugativos, transposones, integrones y secuencias de inserción ⁽¹²⁹⁾). Gracias a las técnicas de secuenciación masiva y de las herramientas bioinformáticas de las que afortunadamente disponemos hoy en día, podemos entender desde una perspectiva ecológica y evolutiva el impacto del uso abusivo de los antimicrobianos (**Figura 1**). En definitiva los antibióticos no solo han sido agentes selectores de mecanismos de resistencia pre-existentes, también han sido aceleradores de la diversidad hacia variantes mas eficientes y de la dispersión en elementos móviles ^(92,96) facilitando el intercambio entre las bacterias procedentes del medio ambiente y bacterias patógenas, y por ello dando lugar a un problema creciente de tratamiento clínico de las enfermedades infecciosas, motivo de preocupación mundial ^(37,73,74,133). Aunque los antimicrobianos y los genes de resistencia estaban presentes en el medio ambiente hace millones de años, nosotros (efecto antropogénico) nos podemos considerar actualmente los mayores responsables de esta situación ⁽¹⁸⁹⁾.

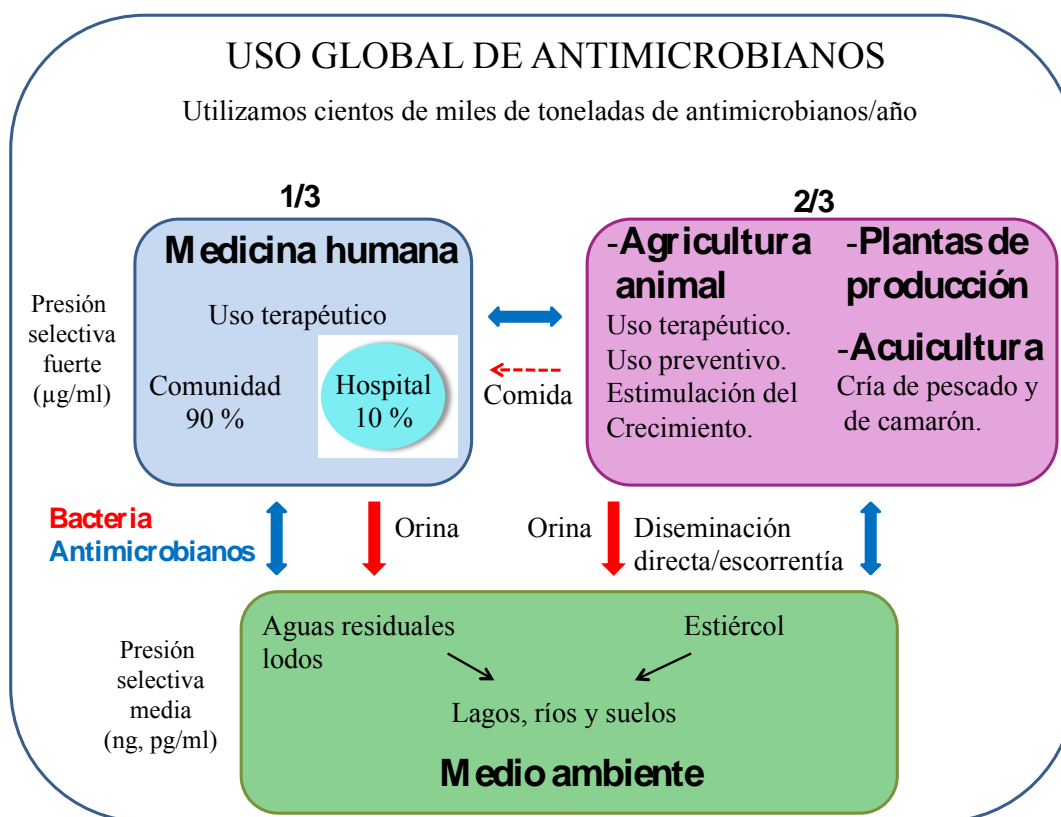


Figura 1. Flujo de antibióticos y bacterias portadoras o no de determinantes de resistencia entre los 3 componentes básicos de nuestro ecosistema (ECCMID 2013, Alemania, Berlín).

1.2.- La cambiante epidemiología de la resistencia antibiótica.

Desde hace varias década, tanto los microbiólogos expertos en resistencia antibiótica como los clínicos implicados en el tratamiento de las enfermedades infecciosas han intentado llamar la atención de la sociedad en general sobre los problemas y consecuencias del mal uso de los antibióticos. Así se definieron días de concienciación para el uso prudente de los antibióticos que progresivamente han ido abriéndose hueco en los medios de comunicación. Pero el problema de la resistencia antibiótica se ve agravada también por un alarmante descenso de los recursos económicos que las compañías farmacéuticas invierten para desarrollar nuevos antibióticos y, aunque algunos se han desarrollado en los últimos años, no parece que puedan dar la respuesta que se espera. Pero a pesar de los esfuerzos de

organismos internacionales como el ECDC, el calado del mensaje se ha mantenido bajo. Sin embargo un cambio en la percepción del problema esta surgiendo en varios foros como el WEF que en sus conclusiones dijo que “el mayor riesgo para la salud humana llegará en forma de las bacterias resistentes” ⁽¹⁰⁶⁾, o el Director General de Sanidad del Reino Unido, que proclamó en Mayo de 2013: “La resistencia a los antibióticos se debe agregar a la lista de amenazas a la seguridad nacional del gobierno del Reino Unido, junto con la pandemia de influenza y el terrorismo” ⁽¹⁾.

Revisando la bibliografía se constata la creciente preocupación por problemas emergentes ⁽²¹²⁾, como la resistencia de cefalosporinas de tercera generación en *Neisseria gonorrhoeae* ⁽²⁶⁹⁾, la resistencia a vancomicina en *Enterococcus*, la mutirresistencia en bacilos gramnegativos no fermentadores como *Acinetobacter* o *Stenotrophomonas* ⁽²⁷⁰⁾, la resistencia XDR-TB (extensively drug-resistant tuberculosis) en *Mycobacterium tuberculosis* ⁽¹³⁸⁾, la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*, SARM (*S. aureus* resistente a meticilina) ⁽¹²⁾ y sobre todo la resistencia a los antibióticos β -lactámicos asociada a multiresistencia en Enterobacterias ⁽¹⁸⁷⁾. Algunos de los microorganismos implicados en estas amenazas preocupantes han sido incluidas bajo el acrónimo de ESKAPE ^(36,187) que corresponden a *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter spp.* A nuestro juicio un acrónimo mas adecuado sería “EESKAPE”, colocando en primer lugar a *Escherichia coli*, sin duda la bacteria que provoca mayor mortalidad en el ser humano, y cuya creciente multiresistencia ha puesto de manifiesto la crisis mundial de la producción de nuevos antimicrobianos.

En el momento de inicio de esta Tesis, las mayores preocupaciones en la epidemiología de la resistencia antibiótica estaban centradas en el impacto de la aparición de las β -lactamasas de espectro-extendido CTX-M ^(108,134), particularmente en *E. coli* y *K. pneumoniae*. El desplazamiento relativo que ha ejercido este grupo de β -lactamasas sobre las β -lactamasas “clásicas” de espectro ampliado derivadas de enzimas tipo TEM o SHV, ha sido uno de los acontecimientos más sorprendentes de la epidemiología de la resistencia

antibiótica de los últimos años ^(43,61). La aparición, diseminación, diversificación y adaptación de este grupo de β -lactamasas ha supuesto un reto para los grupos que trabajan en resistencia antibiótica desde muy diversos puntos de vista: epidemiología molecular, plasticidad enzimática, o estrategias terapéuticas. De hecho la alta tasa de movilización genética por transferencia horizontal de los genes *bla*_{CTX-M} ⁽²¹⁾ ha contribuido a su éxito evolutivo ⁽⁶⁸⁾ y a su selección en plásmidos de multirresistencia ⁽⁸⁰⁾. Por otra parte, las escasas opciones terapéuticas han conducido al consumo elevado de carbapenems, lo que ha generado la emergencia y diseminación de resistencia a estos fármacos, y que es hoy en día uno de los principales problemas de resistencia en Enterobacterias ⁽¹⁵⁵⁾. Todos debemos ser conscientes del problema de la resistencia antibiótica y trabajar en la misma dirección para que se puedan establecer políticas de control a través de las distintas organizaciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS, www.who.org), la EFSA que colabora con la ECDC y EMA que están en continua lucha para abordar este problema que afecta a la salud pública.

2. Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos.

Los antibióticos β -lactámicos, la gran herencia de Robert Fleming, son el grupo de antimicrobianos más ampliamente utilizado en la práctica clínica. En función de su estructura molecular en torno al anillo β -lactámico, se diferencian varias familias como penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenémicos; también existen moléculas sin actividad (o muy escasa) antibiótica pero que se utilizan como inhibidores de β -lactamasas en combinación de un β -lactámico afectado por la resistencia (BLiBL).

Los β -lactámicos son antibióticos bactericidas que actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis del peptidoglicano, fundamental para mantener la integridad estructural de la pared celular bacteriana ⁽¹⁵²⁾. Los β -lactámicos son compuestos análogos a los dos últimos aminoácidos, D-alanina-D-alanina, del pentapéptido que une las largas cadenas de glicano de la pared celular. La similitud estructural que existe entre los antibióticos β -lactámicos y la D-ala-D-ala facilita la unión covalente del β -lactámico al sitio activo de la transpeptidasa que cataliza la última etapa en la formación del peptidoplicano. Las transpeptidasas, gracias

a esta característica de unirse a los β -lactámicos, son "*penicillin binding proteins*" (PBPs, proteínas fijadoras de penicilinas). Es posible, además, que la inhibición de las PBPs (mediante dicha unión irreversible), indirectamente active las autolisinas, las hidrolasas implicadas en el reciclado del peptidoglicano ⁽¹¹¹⁾.

La resistencia frente a este grupo de antibióticos puede ser debida a diferentes mecanismos: i) reducción de la permeabilidad mediante alteraciones de porinas, ii) sistemas de eflujo o expulsión del antibiótico, iii) alteraciones en las PBP y/o iv) degradación del antibiótico por la producción de enzimas conocidas como β -lactamasas ^(154,206,247). Éstas últimas constituyen el mayor éxito estratégico de los microorganismos en su esfuerzo para contrarrestar el efecto bactericida de los antibióticos β -lactámicos.

3. Clasificación de las β -lactamasas.

Se han propuesto diferentes esquemas de clasificación de las β -lactamasas en función de la estructura molecular y de la función o actividad enzimática de la proteína. La primera clasificación funcional basada en el espectro y perfil de sustrato fue propuesta por Richmond y Sykes en 1973 ⁽²¹³⁾. En 1991, Ambler propuso una clasificación basada en la secuencia aminoacídica de la proteína ^(7,8). Posteriormente, las β -lactamasas fueron clasificadas en función de su espectro de acción por Bush-Jacoby-Medeiros en 1995, que fue actualizada en 2010 ^(39,40), **tabla 1**.

a) Clasificación de Ambler. Distingue 4 clases de enzimas (A, B, C y D). Las β -lactamasas de clase A, clase C o clase D se caracterizan por la presencia del aminoácido serina en el sitio activo; las de clase B requieren la presencia de Zn^{2+} para su actividad ⁽⁷⁾.

b) Clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros. La clasificación funcional propuesta por Bush, Jacoby y Medeiros en 1995 y actualizada en 2010 distingue los siguientes cuatro grupos (**tabla 1**):

i) *Grupo 1* (correspondiente a la clase C de Ambler). Incluye enzimas codificadas por genes cromosómicos y/o plasmídicos con actividad cefalosporinasa que no son inhibidas por inhibidores de β -lactamasas.

ii) *Grupo 2* (correspondiente a las clases A y D de Ambler). Es un grupo heterogéneo de enzimas de amplio espectro de sustrato (penicilinasas, cefalosporinasas, oxacilinasas y carbapenemasas) inhibidas por inhibidores de β -lactamasas. Responsables en gran medida del problema global de la resistencia, se divide en diferentes subgrupos: 2a, 2b (y sus variantes 2be, 2br y 2ber), 2c (y sus variantes 2ce), 2d (y sus variantes 2de y 2df) 2e y 2f. Las β -lactamasas pertenecientes a este grupo han sufrido una espectacular diversificación, revelando su gran poder adaptativo en la adquisición de nuevas actividades enzimáticas y prácticamente todos los sustratos pueden ser hidrolizados por algún miembro de este grupo. El subgrupo 2be incluye las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

iii) *Grupo 3* (correspondiente a la clase B de Ambler). Incluye enzimas que requieren Zn^{2+} para su actividad (metalo- β -lactamasas) y que son inhibidas por agentes quelantes como EDTA. No son inhibidas por el ácido clavulánico y no hidrolizan monobactámicos.

iv) *Grupo 4*. Incluido en la clasificación inicial, no aparece en la actualización del año 2010. Agrupa enzimas no inhibidas por el ácido clavulánico y que no se incluyen en las otras categorías.

Desde los años 1990 se está produciendo un incremento dramático en el número de diferentes tipos de β -lactamasas. Se conoce bien que ese incremento está relacionado con el consumo excesivo de antibióticos (aunque otras posibilidades no pueden ser excluidas como la mayor capacidad de secuenciación genómica). De entre esas β -lactamasas, fundamentalmente las pertenecientes a las clases A y D son prácticamente las únicas responsables de ese incremento ⁽³⁹⁾ (**Figura 2**).

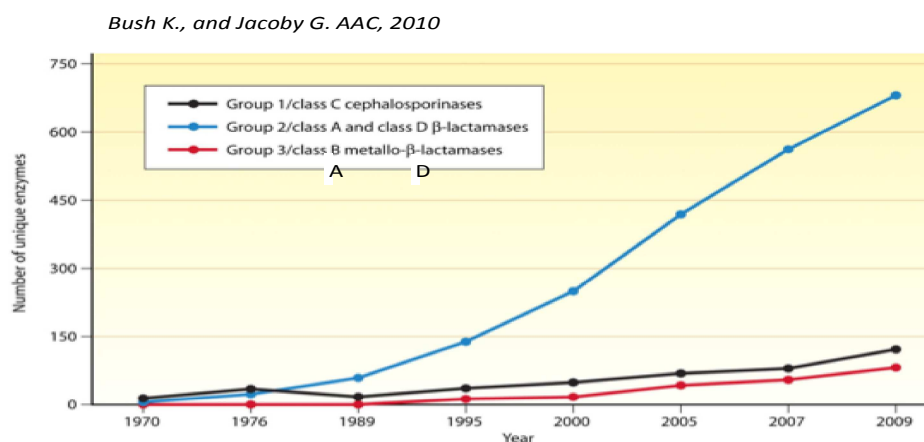


Figura 2.- Representación del incremento en las β -lactamasas descritas. Dibujo obtenido del artículo de Bush and Jacoby 2010.

Tan sólo 4 tipos de enzimas son responsables de este dramático incremento de diversidad: TEM, SHV y CTX-M entre las β -lactamasas de clase A y OXA entre las β -lactamasas de clase D. (**Figura 3**). Las enzimas de la clase B de Ambler (metalo- β -lactamasas) se están sumando a esta tendencia.

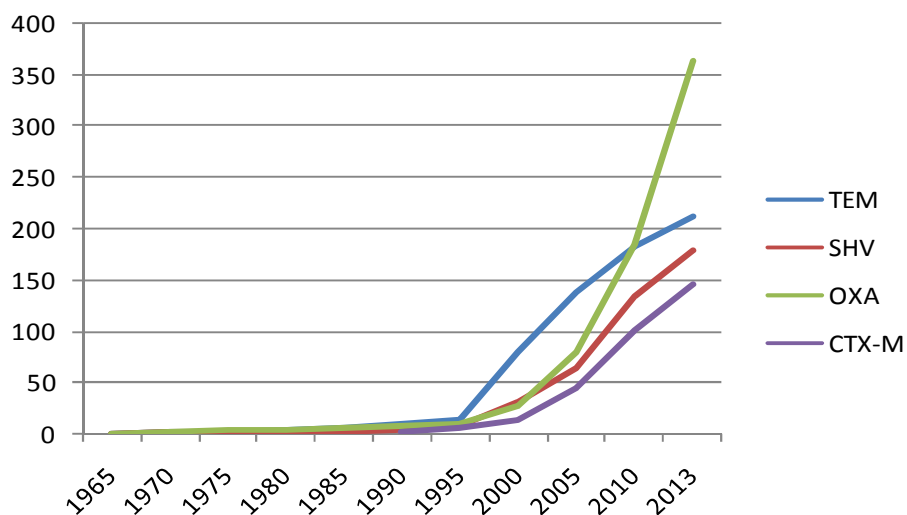


Figura 3. Descripción acumulada de la principales β -lactamasas responsables del incremento de diversidad observado en los últimos años (<http://www.lahey.org/studies/webt.stm>).

Además, en los últimos años, las β -lactamasas tipo CTX-M y OXA han mostrado las mayores pendientes indicando la mayor tasa de diversidad. En el caso de las β -lactamasas tipo OXA principalmente debido a la descripción de carbapenemasas y en el caso de las β -lactamasas tipo CTX-M debido a la expansión de variantes capaces de hidrolizar cefotaxima y ceftazidima simultaneamente.

Tabla 1. Clasificación de beta-lactamasas (Adaptado de Bush y cols., 1995; Bush y cols., 2010).

Bush-Jacoby (2010)	Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Ambler (1980)	Sustrato preferencial	Inhibidos por:		Características	Beta-lactamasas representativas	Localización	Microorganismos
				CLAV o TZB	EDTA				
1	1	C	Cefalosporinas	No	No	Mayor hidrólisis de cefalosporinas que de bencilpenicilinas. Hidrólisis de cefamicinas	AmpC, P99, AACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1	Cromosómica/Plasmídica	Enterobacterias, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1e	NI	C	Cefalosporinas	No	No	Hidrólisis elevada de ceftazidima y de otros oximiino-beta-lactámicos	GC1, CMY-37	Cromosómica/Plasmídica	Enterobacterias
2a	2a	A	Penicilinas	Sí	No	Mayor hidrólisis de bencilpenicilinas que de cefalosporinas	PC1	Cromosómica/Plasmídica	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Citrobacter amalonaticus</i>
2b	2b	A	Penicilinas, cefalosporinas 1ª generación	Sí	No	Hidrólisis similar de bencilpenicilinas y de cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Cromosómica/Plasmídica	Enterobacterias, <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
2be	2be	A	Cefalosporinas 1ª-4ª generación, monobactam	Sí	No	Hidrólisis elevada de oximiino-beta-lactámicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1	Cromosómica/Plasmídica	Enterobacterias, <i>P. aeruginosa</i>
2br	2br	A	Penicilinas	No	No	Resistentes a ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-30, SHV-10	Plasmídicas	<i>Escherichia coli</i>
2ber	NI	A	Cefalosporinas 1ª-4ª generación, monobactam	No	No	Hidrólisis elevada de oximiino-beta-lactámicos y resistencia a clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-50	Plasmídicas	Enterobacterias
2c	2c	A	Carbenicilina	Sí	No	Hidrólisis elevada de carbenicilina	PSE-1, CARB-3	Cromosómica/Plasmídica	<i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i>

Introducción general

Tabla 1. Continuación

Bush-Jacoby (2010)	Bush-Jacoby- Medeiros (1995)	Ambler (1980)	Sustrato preferencial	Inhibidos por:		Características	Beta-lactamasas representativas	Localización	Microorganismos
				CLAV o TZB	EDTA				
2ce	NI	A	Carbenicilina, cefepima	Sí	No	Hidrólisis elevada de carbenicilina, cefepima, y cefpiroma	RTG-4	Plasmídica	<i>Acinetobacter baumannii</i>
2d	2d	D	Cloxacilina	Variable	No	Hidrólisis elevada de cloxacilina y oxacilina	OXA-1, OXA-10	Cromosómica/ Plasmídica	Enterobacterias, <i>P. aeruginosa</i>
2de	NI	D	Cefalosporinas 1 ^a -4 ^a generación	Variable	No	Hidrólisis de cloxacilina, oxacilina y oxiimino-beta-lactámicos	OXA-11, OXA-15	Plasmídica	Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i>
2df	NI	D	Carbapenemas	Variable	No	Hidrólisis de cloxacilina, oxacilina y carbapenemas	OXA-23, OXA-48	Cromosómica/ Plasmídica	Enterobacterias, <i>A. baumannii</i>
2e	2e	A	Cefalosporinas 1 ^a -4 ^a generación	Sí	No	Hidrólisis de cefalosporinas. Inhibición por ácido clavulánico pero no por aztreonam	CepA	Cromosómica/ Plasmídica	<i>Bacteroides</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Proteus vulgaris</i>
2f	2f	A	Carbapenemas	Variable	No	Hidrólisis elevada de carbapenemas, oxiimino-beta- lactámicos y cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1	Cromosómica/ Plasmídica	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>K. pneumoniae</i>
3a	3	B (subgrupo B1 y B3)	Carbapenemas	No	Sí	Hidrólisis de amplio espectro que incluye carbapenemas pero no monobactámicos	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1	Cromosómica/ Plasmídica	Enterobacterias, <i>P. aeruginosa</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

4. Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

En el año 1989, Philippon y *col* ⁽¹⁹⁵⁾ propusieron la designación de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) para enzimas derivadas de β -lactamasas conocidas de espectro reducido, que adquirirían capacidad para hidrolizar cefalosporinas de primera (cefalexina, cefalotina, cefazolina), segunda (cefaclor, cefuroxima), tercera (cefotaxima, ceftazidima, cefixima y ceftriaxona), cuarta generación (cefepima y ceftipiro), y monobactámicos (aztreonam), pero que a diferencia de las β -lactamasas de la clase 1 eran inhibidas por los inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam y a diferencia de las β -lactamasas de la clase 3 no conferían resistencia a carbapenémicos (imipenem y meropenem).

Las BLEE, son por exclusión, miembros del grupo 2 según el esquema de Bush-Jacoby-Madeiros. En función de su secuencia aminoacídica se diferencian BLEEs de la clase A, subgrupo 2be, (tales como TEM, SHV, CTX-M) y de la clase D, subgrupo 2de, tipo OXA. Las primeras son más frecuentemente identificadas en *Enterobacteriaceae*, principalmente entre las especies *K. pneumoniae* y *E. coli*, mientras que las β -lactamasas tipo OXA son más frecuentes en *Acinetobacter spp.* y *P. aeruginosa*. Otros tipos menos frecuentes de BLEE son las β -lactamasas tipo PER, VEB, GES, TLA o IBC que parecen estar confinadas a determinadas zonas geográficas ^(63,166,167,193), <http://www.lahey.org/studies/webt.htm>.

La presencia de secuencias de inserción *corriente arriba* cercanas al gen *bla* ha facilitado la presencia promotores eficientes que incrementan el número de transcritos de estos genes, incrementando el nivel de proteínas y por lo tanto aumentando la resistencia a los antibióticos β -lactámicos. Uno de los ejemplos más conocidos ha sido la *ISEcpI corriente arriba* en cepas portadoras de *bla*_{CTX-M-15}. Además, la localización de los correspondientes genes *bla* en plásmidos facilita su transferencia y persistencia en la población bacteriana ^(193,203). Es cada vez mas frecuente la producción de más de un tipo de BLEE por un determinado microorganismo ^(94,110,223).

En 1984 se describió en Francia, la primera BLEE de tipo TEM inicialmente denominada CTX-1, que posteriormente se nombró como TEM-3, que presentaba dos mutaciones respecto a TEM-2 (E104K y G238S) y que se encontraba en un plásmido conjugativo del grupo de incompatibilidad IncL/M ^(176,235,238). Hasta el momento se han

identificado 86 variantes tipo TEM con fenotipo BLEE de 206 variantes de TEM descritas. Las β -lactamasas de tipo TEM con fenotipo BLEE derivan por mutaciones puntuales en las posiciones 104, 164, 238, 240 de las β -lactamasas TEM-1 y TEM-2 ⁽¹⁷⁶⁾ o combinaciones de estas ⁽²⁶¹⁾ (**tabla 2a**). La mayoría de estas enzimas se han descrito en *E. coli* y *K. pneumoniae*, aunque también se han identificado en otras especies de Enterobacterias como *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* y *Salmonella* spp. y también en *P. aeruginosa* ⁽³⁴⁾. Las enzimas TEM derivan de los genes *bla*_{TEM} que se encuentran localizados en derivados de Tn3 (*bla*_{TEM-1a}), Tn2 (*bla*_{TEM-1b}) y Tn1 o Tn801 (*bla*_{TEM-2}) ⁽¹⁷⁶⁾.

Las β -lactamasas de tipo SHV con fenotipo BLEE derivan de la β -lactamasa cromosómica de *K. pneumoniae* SHV-1 ⁽¹⁹³⁾. La primera BLEE de este tipo, que también fue la primera BLEE descrita, se detectó en 1983 en Alemania en un aislado de *K. ozaenae* que presentaba un fenotipo de resistencia poco habitual y que se transfería por conjugación ⁽¹²⁰⁾. Se trataba de la variante SHV-2 que difería de su predecesor SHV-1 en una mutación puntual (cambio aminoacídico G238S) ⁽¹²⁰⁾. Hasta el momento se han descrito 44 enzimas SHV con fenotipo BLEE, entre las 171 variedades descritas de SHV (<http://www.lahey.org/Studies/>) (**tabla 2b**). Se han detectado en diferentes especies de Enterobacterias, principalmente en *E. coli* y *K. pneumoniae* aunque también en *P. aeruginosa* y en *Acinetobacter* spp. ^(104,193). La movilización del gen cromosómico *bla*_{SHV-1} del que derivan los diferentes genes *bla*_{SHV} está asociada a la secuencia de inserción IS26 ⁽⁸⁹⁾.

Como se comentaba en el apartado de clasificación de las β -lactamasas, el incremento fundamental de la diversidad de variantes descritos desde 1990 se debía a dos clases de β -lactamasas, las de tipo OXA y las de tipo CTX-M. En ambos grupos existe un elevado porcentaje de variantes clasificadas como BLEE (en el caso de β -lactamasas tipo CTX-M todas son BLEE, con alta probabilidad, β -lactamasas naturales con un fenotipo que se asemeja a las BLEE derivadas de β -lactamasas de espectro reducido). Varios trabajos han hecho eco de este incremento dramático de las BLEE (**Figura 4**).

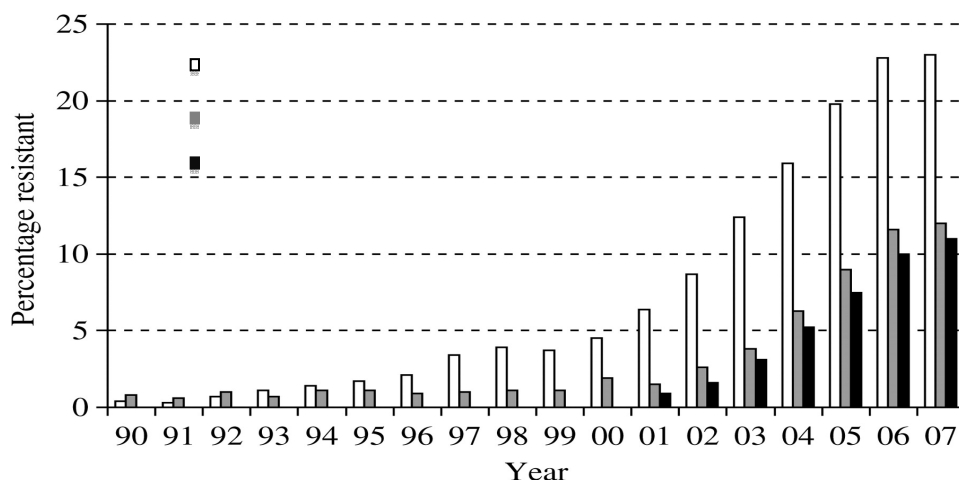


Figura 4.- Evolución temporal del incremento de β -lactamasas BLEE en los últimos años. En blanco describe la resistencia a fluorquinolonas, en gris la resistencia a oximino-cefalosporinas y en negro la coresistencia a ambas familias de antibióticos ⁽¹³²⁾.

5. La emergencia de las β -lactamasas del tipo CTX-M.

En 1986, se describió en Japón una cepa de *E. coli* portadora de una nueva BLEE, denominada entonces FEC-1 ⁽¹⁵³⁾ que fue posteriormente identificada como CTX-M-3, si bien no será hasta 1989 cuando se reconoció la existencia de una nueva familia β -lactamasas, las de tipo CTX-M, y casi de forma simultánea, en Europa y en América del Sur. La primera publicación, en Alemania, y describe CTX-M-1 en un aislado de *E. coli* con fenotipo de resistencia a CTX y sensibilidad a CAZ ⁽²⁴⁾. En Argentina se detectó otro aislado de *Salmonella typhimurium* con el mismo fenotipo y portador de un enzima con diferente punto isoeléctrico que la descrita anteriormente, y se la denominó CTX-M-2 ⁽²³⁾. También en 1989, pero en Francia, se identificó MEN-1, la primera β -lactamasas de tipo CTX-M de la que se conoció su secuencia ⁽²²⁾ y en 1996 cuando se secuenciaron CTX-M-1 y CTX-M-2, se comprobó que MEN-1 correspondía a CTX-M-1 ⁽²⁵⁾. Otras dos enzimas aisladas en los años 1990 fueron Toho-1 y Toho-2 en Tokio. La posterior secuenciación demostró su alta homología con CTX-M-2 y se renombraron como CTX-M-44 (Toho-1) y CTX-M-45 (Toho-2). En 1994 se detectó el primer aislado de *E. coli* productor de CTX-M-9 en Francia y en 1996, en Brasil, el primer aislado productor de CTX-M-8 ⁽³¹⁾.

La primera publicación en España en la que se hace referencia a estas enzimas se corresponde con cepas de *E. coli* y *Salmonella* spp. con CTX-M-9 detectadas entre 1996 y 2000 en Barcelona y Murcia ^(226,232). Asimismo, en 1997 se describe en Madrid, en el Hospital Universitario Ramón y Cajal, el aislamiento de *E. coli* con CTX-M-10 ⁽¹⁸³⁾, aunque el análisis retrospectivo de aislados con este tipo de enzimas en el mismo hospital confirma su presencia desde 1990 en *K.pneumoniae* y desde 1991 en *Enterobacter* spp. y en *Citrobacter freundii* ^(48,62,257). También, en un estudio prospectivo realizado en el Hospital Virgen Macarena de Sevilla, entre 1995 y 2003, se detectaron los primeros aislados de *K. pneumoniae* y *E. coli* con CTX-M en 1998 y 1999, respectivamente ⁽²²³⁾.

A diferencia de las BLEE de tipo TEM y SHV, las β -lactamasas de tipo CTX-M no derivan de variantes de espectro reducido (o no se ha identificado la proteína ancestral). Todas las β -lactamasas tipo CTX-M tienen una gran actividad hidrolítica frente a cefotaxima (por ejemplo CTX-M-3) y algunas de sus variantes también hidrolizan ceftazidima, aunque en menor grado (por ejemplo CTX-M-15, derivada de CTX-M-3 con el cambio único D240G). Las β -lactamasas de tipo CTX-M son realmente un grupo complejo de al menos cinco grupos de enzimas [se muestra un árbol filogenético en la **figura 4** ⁽⁴⁴⁾]. Se clasifican, según su secuencia de aminoácidos, en cinco grupos filogenéticos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25, y hasta la fecha se han descrito 142 variantes del conjunto de los grupos (<http://www.lahey.org/Studies/>) ^(43,225). Las BLEE de tipo CTX-M derivan de β -lactamasas cromosómicas de distintas especies de *Kluyvera*. El origen del grupo CTX-M-2 parece estar en genes de *K. ascorbata*, los grupos CTX-M-8 y CTX-M-9 habrían evolucionado a partir de genes de *K. georgiana* y el grupo CTX-M-1 posiblemente de *K. cryocrescens*. Por el contrario, el origen del grupo CTX-M-25 no se ha identificado de forma precisa pero se cree que también podría derivar de otros miembros del género *Kluyvera* ^(184,215,225). La movilización de los genes cromosómicos de los que derivan los distintos tipos de CTX-M, parece haberse producido a través de secuencias de inserción como *ISEcp1* o *ISCRI*, o secuencias relacionadas con bacteriófagos ^(182,225,254). En algunos

casos los genes *bla*_{CTX-M} se han asociado a IS26, aunque no existen estudios que asocien directamente a esta secuencia de inserción con eventos de movilización ^(65,131).

Introducción general

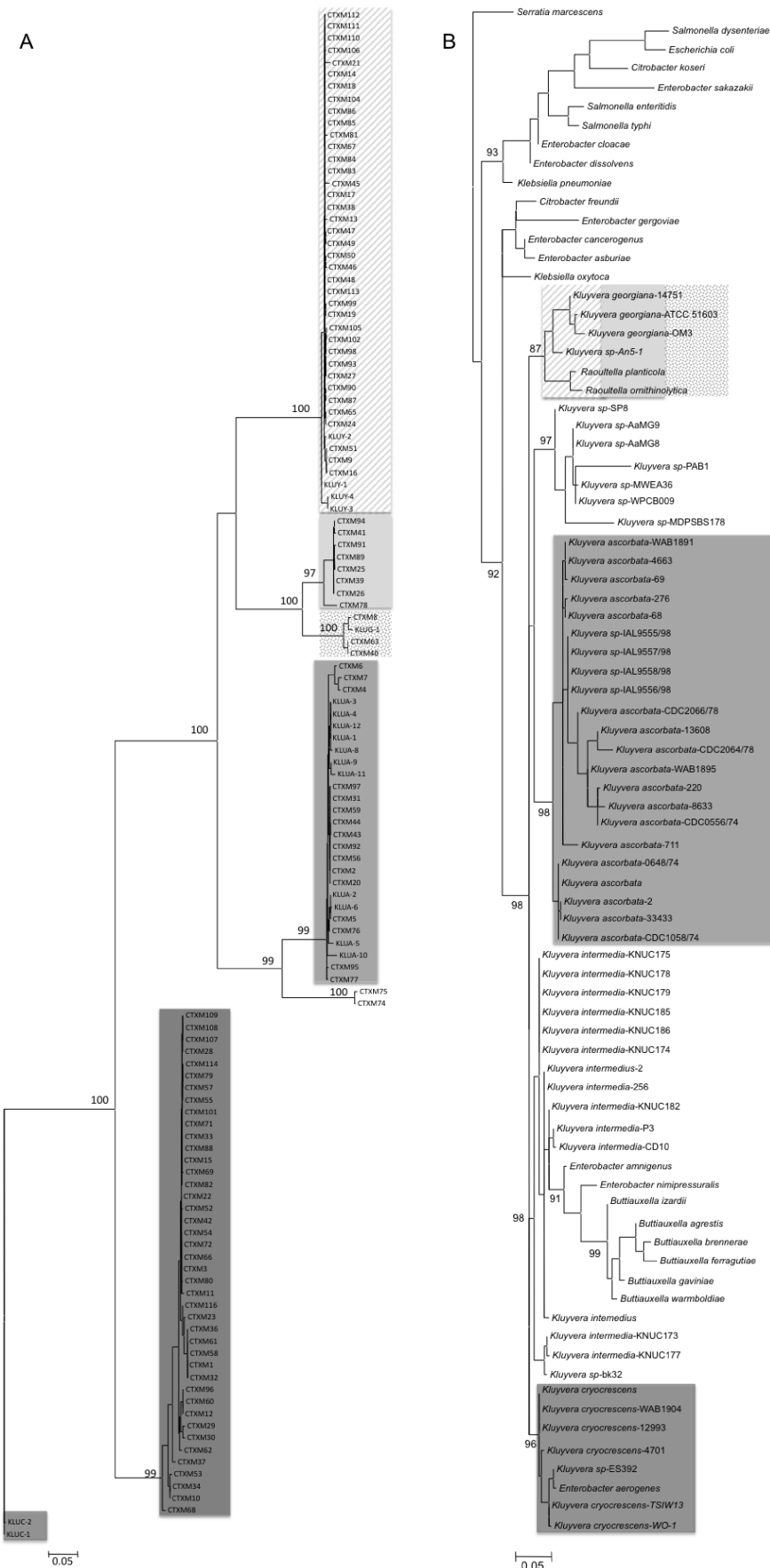


Figura 4. Representación del árbol filogenético de los genes *bla*_{CTX-M} y del ADNr 16S de *Kluyvera* spp. **(A)** El árbol filogenético de los genes *bla*_{CTX-M} (n=109 y 17 genes cromosómicos de *Kluyvera*) que se obtuvo en nuestro laboratorio mediante el programa PhyML_3.0 (846 nt). El modelo de sustitución nucleotídica de Tamura Nei, que se utilizó como modelo de evolución, se eligió según el criterio probabilístico inferido por el programa jModeltest. Para definir probabilísticamente la verosimilitud de la topología del árbol obtenido (robustez) se realizaron 1000 réplicas elegidas al pseudoazar (*bootstrap*). Se consideró como nodo o linaje evolutivo cierto cuando el valor probabilístico de *bootstrap* fue >95%. **(B)** Árbol filogenético del ADNr 16S de *Kluyvera* spp. (n=55) y las especies relacionadas que se descargaron de la página web www.ncbi.nlm.nih.gov, se hizo utilizando PhyML_3.0 (1310 nt). El programa jModeltest determinó que en esta ocasión el modelo evolutivo Hasegawa-Kishino-Yano reproduciría el escenario mas probable. Los árboles filogenéticos fueron visualizados utilizando el programa MEGA 5.0.

Se han encontrado variantes de CTX-M en diferentes especies de Enterobacterias ampliamente diseminadas, tanto en el compartimento hospitalario como en la comunidad y distribuidas por todo el mundo, constituyendo en la actualidad el grupo más prevalente de BLEEs ⁽⁴³⁾. Se han encontrado β -lactamasas CTX-M en animales domésticos ⁽⁴⁹⁾, en aves de corral y aves salvajes ^(97,204), en ganado vacuno ^(162,231), en carnes ⁽⁴⁾ y en mamíferos salvajes ⁽⁶⁴⁾; esta diseminación global provoca una importante preocupación por la posible extensión de las fuentes de contaminación para humanos y animales.

La diseminación de las β -lactamasas CTX-M se produce de forma asimétrica, esto es, con cierta especificidad geográfica, que podría atribuirse a la asociación de ciertas enzimas con determinados clones de dispersión regional, y, en alguna medida, consecuencia del perfil local de consumo de antibióticos. Desafortunadamente, la falta de estudios epidemiológicos que hayan analizado tanto la clonalidad de las cepas como los plásmidos portadores de CTX-M, ha hecho que exista un desconocimiento sobre la emergencia y diseminación de estas primeras CTX-M. Más aún, tampoco se han realizado estudios epidemiológicos acerca de estas enzimas en el periodo de finales de los 80 en el sureste de

Asia (un punto importante en la emergencia de β -lactamasas), que hubieran ayudado a entender mejor la diseminación actual de algunas BLEEs de importancia clínica como son CTX-M-3, CTX-M-9, CTX-M-14 y CTX-M-15.

6. Evolución de las BLEE-CTX-M. Fuerzas de selección y diversificación.

Los antibióticos β -lactámicos constituyen probablemente la familia de antimicrobianos en la que se ha realizado un mayor número de modificaciones químicas con la intención de ampliar su espectro. Este proceso de ingeniería química, que ha llevado al desarrollo de nuevos β -lactámicos de uso clínico, ha debido influenciar el hecho de que las β -lactamasas sean las enzimas de inactivación de antibióticos que más se han diversificado en un proceso evolutivo hacia un espectro de actividad ampliado ⁽⁹⁸⁾.

En los últimos años, las β -lactamasas de tipo CTX-M junto con las OXA, han sido las que han evolucionado hacia un mayor número de variantes diferentes, esto es, han sido sometidas a un alto grado de diversificación molecular ⁽³⁸⁾. Los árboles filogenéticos de las enzimas de tipo CTX-M sugieren que en un corto periodo de tiempo, se ha producido una gran diversificación a partir de los genes *bla*_{CTX-M} originales ⁽¹⁷⁸⁾. Las primeras CTX-Ms identificadas tenían capacidad de hidrolizar CTX, mientras que su afinidad por CAZ era baja o nula. Sin embargo, actualmente más del 60% de las CTX-Ms son capaces de hidrolizar ambas cefalosporinas con una eficiencia similar. Por ello, los trabajos de nuestro laboratorio han sugerido que la CAZ podría haber sido una de las principales fuerzas selectivas que ha contribuido a esta diversificación. Las enzimas de la familia CTX-M-1 son las que han sido sometidas a un proceso más eficaz de diversificación (26 variantes), y es en esta familia donde más variantes resistentes a CAZ se han identificado. Algunas de ellas han adquirido un interés adicional debido a su diseminación en distintos compartimentos y/o en amplias áreas geográficas, como CTX-M-15 (a nivel mundial) y CTX-M-32 (animales y humanos) ^(33,35,43,50,61,200).

Las mutaciones implicadas en la adquisición de la resistencia frente a CAZ entre las β -lactamasas tipo CTX-M aparecen, de acuerdo con esquema de Ambler y *col.* ⁽⁸⁾ en la

posición 167 (reemplazamiento de prolina por serina, treonina o glutamina, P167S/T/Q) o bien en la posición 240 (aspártico por glicina, D240G). Estos variantes se han descrito tanto en la clínica ^(14,50,201,241), como en el laboratorio ^(76,117,177,262). En un estudio de nuestro grupo se ha demostrado que la presencia simultanea de ambos cambios (P167S/T/Q y D240G) no es tolerable adaptativamente y que por tanto deben haberse originado en dos rutas evolutivas diferentes. En el mismo estudio se refleja también, que además de la implicación que tienen las mutaciones en las posiciones 167 y 240 en la resistencia a CAZ, la selección de otros cambios secundarios como A77V y N106S también habrían tenido un papel importante en la evolución de las enzimas del grupo CTX-M-1 ⁽¹⁷⁷⁾.

Este proceso diversificador de las β -lactamasas tipo CTX-M desde un espectro BLEE que conferiría resistencia solamente a CTX hacia un espectro CTX+CAZ, puede considerarse la primera etapa evolutiva en estas β -lactamasas que, sometidas a un proceso selectivo, adquieren nuevas capacidades enzimáticas. La descripción de bacterias con más de un tipo de CTX-M ^(164,169,242), sugiere que la aparición de nuevas variantes, resultante de procesos de recombinación, sea un peligro inminente. De hecho se ha descrito ya una β -lactamasa tipo CTX-M, CTX-M-64 que resulta de un evento de recombinación entre miembros de los grupos CTX-M-1 y CTX-M-9 ⁽¹⁶⁸⁾. Es pues evidente que la dispersión y el incremento de la prevalencia de β -lactamasas tipo CTX-M facilitará nuevas oportunidades para la aparición y selección de nuevas variantes, pero no sabemos si esas hipotéticas nuevas variantes podrían aportar una nueva actividad hidrolítica a este tipo de β -lactamasas como ha ocurrido en las β -lactamasas tipo TEM o SHV, donde se han descrito variantes con fenotipo BLEE-TEM/SHV y también variantes resistentes a BLiBLs (IRT/IR-SHV). La hipersensibilidad a BLiBL es una característica frecuente de las enzimas que adquieren previamente un fenotipo BLEE. Este fenómeno de antagonismo pleiotropico, en el que la adaptación a un agente selectivo supone la desadaptación a otro parece ser un hecho universal en β -lactamasas tipo TEM, SHV y ROB.

De hecho, han sido descritos pocas β -lactamasas TEM y SHV con capacidad para conferir resistencia a BLiBLs y a oximino-cefalosporinas con cambios mutacionales en el

mismo enzima. En la actualidad se han detectado (24 de Julio de 2013, último acceso a <http://www.lahey.org/Studies/>) 11 variantes naturales de tipo TEM con cambios aminoacídicos implicados en los fenotipos de resistencia a oximino-cefalosporinas (BLEE) y de resistencia a BLiBL, los denominados originalmente variantes CMT (*complex mutant TEM*), que en el caso de CTX-M deberían nombrarse CM-CTX-M, clasificados como 2ber en <http://www.lahey.org/Studies/> (tabla 3).

Hasta el momento no se han encontrado variantes moleculares de CTX-M que confieran resistencia simultánea a BLiBLs y a oximino-cefalosporinas en la clínica. ¿Cuál es la causa que explica esta falta de detección?. La resistencia a la combinación BLiBL puede deberse no sólo a la selección de variantes moleculares en la β -lactamasa (como los enzimas IRT), a la hiperproducción de estos enzimas, como se ha observado en TEM-1 o, en menor grado, en SHV-1 (menos frecuente), o bien a la hiperexpresión o desrepresión de la β -lactamasa cromosómica AmpC, o a la combinación de una β -lactamasa con la pérdida de porinas de membrana OmpF y /o OmpC. En el caso de las BLEE de tipo CTX-M, la mayor parte de resistencias a la combinación BLiBL está relacionado con la selección y expansión clonal de aislados que expresan simultáneamente CTX-M-15 y OXA-1 (con sensibilidad disminuida a estos compuestos) ⁽⁶¹⁾. Otras posibilidades, como CTX-M hiperexpresada, combinaciones CTX-M y AmpC, CTX-M y defectos de porinas, podrían considerarse. Sin embargo en esta Tesis analizaremos las posibilidades adaptativas de cambios en la secuencia enzimas CTX-M para adquirir resistencia a BLiBLs y que efectos fenotípicos tendrán estas variantes, tanto para su posible selección en la clínica, como para su posible detección en el laboratorio.

Introducción general

Tabla 2a. BLEE de tipo TEM. Mutaciones implicadas en el fenotipo BLEE.

BLEE-TEM	Mutaciones únicas				Combinaciones ventajosas				Combinaciones desventajosas	
	104	164	238	240	164+240	104+238	104+164	238+240	104+240	164+238
94	43	47	34	28	16	18	18	9	4	3
(%)	45,7	50	36,2	29,7	57,1	52,9	41,8	32	14,2	8,8

Tabla 2b. BLEE de tipo SHV. Mutaciones implicadas en el fenotipo BLEE. ⁽¹⁰⁴⁾

BLEE-SHV	Mutaciones únicas				Combinaciones ventajosas	
	179	205	238	240	238+240	205+238
45	3	2	26	21	18	2
(%)	6.7	4.4	57.8	46.7	40	4.4

Tabla 3. BLEE de tipo TEM con fenotipo CMT. Mutaciones implicadas en el fenotipo de resistencia a cefalosporinas de espectro ampliado (fenotipo BLEE), a la combinación de BLiBLs (fenotipo RI), o a ambos (combinación de varias mutaciones).

TEM(2ber)	Mutaciones Resistencia inhibidores				Mutaciones BLEE				Combinaciones		
	39	69	276	275	104	164	238	240	69+164	275+238	275+240
12	3	6	4	1	4	6	4	3	5	1	1
(%)	25	50	33.3	8.3	33.3	50	33.3	25	41.7	8.3	8.3

La presente Tesis se estructura por capítulos en tres módulos que intentan abordar el problema de la evolución de las β -lactamasas de tipo CTX-M para adquirir espectros ampliados de actividad, incluyendo la resistencia a la combinación de un β -lactámico más un inhibidor de β -lactamasa desde tres aspectos diferentes:

1.- ¿Es posible la evolución hacia nuevos espectros de acción de las β -lactamasas de tipo CTX-M?. Capítulo 1. Resultados publicados en la revista *Antimicrob. Agent. Chemother.* **2011.**

2.- Si existieran estas variantes, ¿pueden ser detectadas en la práctica clínica?. Capítulo 2. Resultados enviados para publicación a la revista *Journal of Antimicrob. Chemother.* **Julio 2013.**

3.- ¿Existen restricciones farmacodinámicas y/o biológicas que impiden la selección de estas variantes que expliquen su ausencia en la Naturaleza? Capítulo 3. En preparación para *Antimicrob. Agent. Chemother.*

CAPÍTULO 1.

Selección *in vitro* de variantes de *Escherichia coli* productores de CTX-M resistentes a la combinación de β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas (BLiBL).

Introducción

1. Escenario actual del tratamiento de las infecciones por bacterias productoras de BLEE.

Como se comentaba en la introducción general, el tratamiento empírico recomendado para las infecciones graves producidas por microorganismos productores de BLEE de tipo CTX-M se ha basado en la aplicación de antibióticos del grupo de los carbapenems^(187,197). Antibióticos no β -lactámicos, como fosfomicina, se han recomendado para infecciones no complicadas del tracto urinario⁽⁸⁷⁾. Sin embargo, el aumento en el consumo de carbapenems^(186,188) se ha seguido de la emergencia y selección de nuevos mecanismos de resistencia como las carbapenemasas de tipo KPC, NDM o VIM,^(66,208,246) incluyendo cepas productoras de CTX-M^(51,158,186). Un proceso similar ha ocurrido con las enzimas FosA3 y FosC2, involucradas en la resistencia a fosfomicina⁽²⁵⁹⁾. Estos fenómenos ejemplifican la idea del capitalismo genético en la evolución bacteriana⁽¹⁶⁾.

Los efectos anteriormente señalados han forzado a replantear las posibilidades terapéuticas de la utilización de BLiBLs, habiéndose obtenido resultados positivos en el tratamiento de infecciones leves, pero también aquellas de mayor severidad^(216,256). Si bien las BLEE mantienen su sensibilidad a inhibidores de β -lactamasas, y las cepas con BLEE suelen ser muy sensibles al efecto de la combinación BLiBLs, el uso en clínica de estos antibióticos es aún controvertido en el tratamiento de las infecciones causadas por estas bacterias^(198,210,217,218,220). Curiosamente no se han descrito hasta el presente variantes CTX-M resistentes a inhibidores de β -lactamasa⁽⁴⁷⁾ alto consumo de AMC y PTZ en la población humana^(83,99,221).

Aunque anteriormente referíamos que las β -lactamasas tipo BLEE permanecen sensibles al efecto de inhibidores de β -lactamasa, el porcentaje de resistencias frente a BLiBLs encontrado en Europa es del 12% y del 25% en aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE, respectivamente^(77,221). Estas resistencias son debidas a la coproducción de varias β -lactamasas, como CTX-M-15 y OXA-1⁽⁶¹⁾. CTX-M-15 confiere fenotipo BLEE y OXA-1 confiere sensibilidad disminuida a BLiBLs. En otros casos la presencia de una β -lactamasa con fenotipo BLEE es asociada con la pérdida de porinas⁽²⁶⁰⁾

o con desrepresión/hiperproducción de β -lactamasas cromosómicas ^(102,149,185) o con hiperproducción de TEM-1 ⁽¹⁴⁹⁾. Podría esperarse que, dado que las CTX-M son BLEE, podría ocurrir un antagonismo pleiotópico entre el fenotipo BLEE y el fenotipo de resistencia a BLiBL, tal y como ocurre en β -lactamasas BLEE tipo TEM. Este fenómeno podría estar relacionado con los cambios estructurales que modifican el entorno molecular del centro activo de la β -lactamasa, y que deben “elegir” configuraciones para poder albergar moléculas voluminosas (como CTX y CAZ) o bien moléculas pequeñas (como clavulánico), produciéndose una “compensación negativa” en la eficiencia catalítica ⁽¹¹⁴⁾.

2. Evolución de la resistencia antibiótica.

Como se ha señalado anteriormente (en el primer punto de la Introducción General), el problema de la resistencia a los antimicrobianos constituye una preocupación a nivel mundial. Cada vez va teniendo más fuerza la idea de que la selección y la diversificación explosiva de los mecanismos de resistencia comenzó en el momento en que los antibióticos se empezaron a reproducir y sobreconsumir en la práctica médica, veterinaria y en agricultura, actuando tanto como fuerzas selectoras de mecanismos de resistencia como promotoras de la diversificación de los mecanismos seleccionados ⁽⁹²⁾. Hoy en día un número creciente de biólogos evolucionistas emplean la selección de resistencia antibiótica en los diseños experimentales para comprender conceptos básicos de evolución porque en otros modelos la posibilidad de detectar con alta frecuencia la aparición de mutaciones beneficiosas es, comparativamente, relativamente escasa.

Una estrategia para contener este problema es minimizar la probabilidad de que surja la resistencia antibiótica. Para alcanzar este objetivo necesitamos comprender los factores que dirigen y constriñen la evolución. Hay dos factores cruciales en la evolución de la resistencia antibiótica: antagonismo y epistasis. El antagonismo ocurre cuando una simple mutación afecta a múltiples caracteres fenotípicos, mientras que la epistasis ocurre cuando mutaciones en diferentes loci interactúan de una manera no adaptativa en sus efectos sobre un fenotipo, es decir cuando el efecto de una mutación depende de la presencia de otras mutaciones. La epistasis tiene un papel principal cuando la resistencia antibiótica requiere la acumulación secuencial de mutaciones. El conocimiento de los efectos pleiotrópicos y/o epistáticos permite inferir trayectorias evolutivas, básicas para inferir la posibilidad de aparición y

selección de resistencia antibiótica. Así, cuando el efecto de una mutación puede ser beneficiosa o deletérea dependiendo de la presencia de otras mutaciones seleccionables a través de un determinado fenotipo (fenómeno conocido como epistasis de señal), dicha dependencia implica fuertes constricciones evolutivas, con una fuerte restricción de las posibilidades adaptativas ⁽²⁶¹⁾. El mejor ejemplo de pleiotropismo se ha comentado en la introducción general de esta Tesis, el antagonismo pleiotropico, cuando el incremento del espectro de acción de un determinante de resistencia supone la pérdida de otra capacidad enzimática implicada en un segundo tipo de resistencia.

3. Predicción de la resistencia antibiótica.

La predicción de la resistencia y de su éxito evolutivo requiere un análisis multifactorial y por lo tanto difícil de establecer con certeza. La resistencia antibiótica no es solo el resultado de la selección dirigida por los antibióticos como se ha considerado habitualmente, sino un proceso extraordinariamente complejo, pues las fuerzas de selección pueden ser diferentes dependiendo de cual es la unidad de selección (una unidad de selección puede ser una bacteria o una población bacteriana, pero también unidades subcelulares como plásmidos). Además de las unidades de selección, otros factores contribuyen a complicar la predicibilidad de la evolución como el coste biológico, la tasa de mutación y el tamaño poblacional, los cuales determinarán que posibles rutas evolutivas serán de hecho seleccionables. Estos factores revelan la complejidad de la predicción de la resistencia e indican la absoluta necesidad de un abordaje multifactorial que abarca desde la vigilancia epidemiológica de los determinantes de resistencia, a la necesidad de aplicar modelos evolutivos *in vitro* y la modelización *in vivo* de la biodisponibilidad y farmacodinámica de los antibióticos en diferentes compartimentos para comprender y predecir los cambios dirigidos por el hombre en el mundo bacteriano ⁽¹⁷⁾.

Para poder predecir la probabilidad que tiene un gen o *pre*-gen de resistencia para establecerse en una población bacteriana, conferir resistencia antibiótica o adquirir nuevos espectros de acción, deben llevarse a cabo, entre otras, las siguientes aproximaciones ^(18,148,178).

A) Conocer el “universo” de mecanismos de resistencia existentes.

Los estudios metagenómicos permiten detectar genes de resistencia (resistoma) o potenciales genes de resistencia (*pre-resistoma*) tanto en el medio ambiente ⁽¹⁴⁵⁾, como en cualquier entorno que pudiera interactuar con microorganismos patógenos, como el microbioma humano ⁽²³⁷⁾.

B) Determinar la probabilidad de selección de los mecanismos de resistencia.

b.1- Realizar estudios de evolución *in vitro* con potenciales genes de resistencia del resistoma que podrían estar involucrados en futuras resistencias a antibióticos. Aunque la captación de un determinante de resistencia desde una bacteria ambiental o comensal a una bacteria patógena es un fenómeno azaroso aquellos determinantes procedentes de poblaciones bacterianas que puedan compartir nicho ecológico con bacterias patógenas tendrán mayor posibilidad de ser capturados, como el resistoma del microbioma intestinal humano. Esos determinantes deben ser estudiados para explorar sus capacidades hidrolíticas más eficientes.

b.2- Explorar la capacidad adaptativa de genes conocidos de resistencia para adquirir nuevos espectros de acción ⁽¹⁴⁷⁾.

b.3- Determinar las fuerzas de selección que han influido más en el proceso de diversificación que ha llevado a la emergencia de variantes mas específicos de resistencia a antimicrobianos concretos ⁽¹⁷⁸⁾.

b.4-Modelizar la emergencia de la resistencia a antibióticos utilizando herramientas de biología de sistemas.

b.5- Identificar genotipos que confieran fenotipos antagónicos (antagonismo pleiotrópico) que pudieran tener transcendencia en la elección de combinaciones antibióticas en el individuo o la comunidad ⁽¹⁰⁰⁾.

C) Valorar el grado de estabilidad y diseminación de los mecanismos de resistencia en las poblaciones bacterianas una vez adquirido.

c.1- Estimar el coste biológico (*fitness*) ligado a la adquisición de un determinante de resistencia, tanto *in vitro* como *in vivo*. El coste biológico es un parámetro de claro impacto sobre la frecuencia de desarrollo de resistencias y puede predecir de manera concisa en modelos matemáticos la tasa de emergencia, y también de mantenimiento en el tiempo de

las resistencias, en función de la densidad de uso del antibiótico, o de su eliminación del consumo ⁽¹⁰⁾.

c.2- Desarrollo de modelos matemáticos centrados en la dinámica de poblaciones, para estudiar el comportamiento de las poblaciones sensibles y resistentes en presencia y ausencia del antibiótico ⁽¹³⁷⁾.

c.3- Identificar las plataformas genéticas que albergan los genes de resistencia, así como el grado de captura y las tasas de transferencia genética horizontal entre diferentes hospedadores. El extraordinario desarrollo de la epidemiología molecular nos ha permitido describir asociaciones particularmente exitosas en la diseminación de genes de resistencia, responsables de brotes epidémicos a nivel mundial, como la asociación del clon de *E.coli* ST131 con plásmidos *IncFII* en la diseminación de β -lactamasas de tipo CTX-M ⁽²⁶⁶⁾.

Es muy importante la detección precoz de nuevos mecanismos de resistencia frente a antibióticos que todavía son útiles en el ámbito clínico, pero también analizar la capacidad adaptativa de genes de resistencia ya presentes. Para ello, es necesario realizar un seguimiento epidemiológico muy activo e intentar predecir los nuevos mecanismos de resistencia propensos a evolucionar, teniendo en cuenta tanto los elementos genéticos como las especies bacterianas que colaboran en su diseminación.

3.1. Predicción basada en parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos (PK/PD)

Desde un punto de vista clínico, la resistencia antibiótica se define como la persistencia de los signos y síntomas relacionados con un proceso infeccioso y la detección del microorganismo patógeno antes y después de un tratamiento antibiótico a dosis adecuadas. La definición de dosis antibiótica adecuada queda establecida por dos parámetros: PK/PD (farmacocinética/farmacodinamia), generalmente reducidos a los datos de biodisponibilidad y concentración mínima inhibitoria (CMI), que expresa la susceptibilidad bacteriana al antibiótico ensayado. Los puntos de corte clínicos, se calculan teniendo en cuenta los parámetros PK/PD. Se definen los parámetros PK/PD como la relación existente entre la concentración antibiótica a lo largo del tiempo en el sitio de acción (farmacocinética) y la inhibición o muerte microbiana *in vivo* (farmacodinámica). Los parámetros farmacocinéticos, como el área bajo la curva y la concentración máxima

alcanzada, C_{max} , una vez establecidos *in vivo*, se correlacionan y ajustan con los valores de CMI obtenidos *in vitro*. En realidad en la actualidad se consideran asociaciones mas complejas de parámetros, como el “intervalo de tiempo tras una dosis en que la concentración está por encima de la CMI” o el “área bajo la curva de concentración antibiotica que supera la CMI”. El objetivo simple será que el mayor tiempo posible la concentración de antibiótico sea superior a la CMI obtenida *in vitro*, pero en algunos antibióticos es sobre todo la C_{max} la que se relaciona con el éxito terapéutico. Una vez establecidos estos valores, los dos comités principales que establecen las recomendaciones sobre los puntos de corte ajustados (*breakpoints*) son: *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) y *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), dependientes de FDA (*Food and Drug Administration*) y EMA (Agencia Europea de Medicamentos), respectivamente.

Desde un punto de vista microbiológico, se define una bacteria como resistente cuando el valor de CMI *in vitro* es superior a la concentración que el antibiótico alcanza en el sitio de la infección. Las bacterias resistentes se pueden detectar utilizando los valores ECOFF (*epidemiological cut-off*), que son valores de CMI que separan la población salvaje de la que posee algún mecanismo que las permite crecer en presencia del antibiótico. En ocasiones la determinación de la CMI dentro de una especie bacteriana tiene una distribución bimodal que permite diferenciar las poblaciones resistentes de las sensibles. En esas circunstancias los ECOFF coinciden con los puntos de corte clínicos de sensibilidad y resistencia. Por el contrario, si no se observa esa distribución bimodal, resulta más complicado definir los valores ECOFF y puntos de corte clínicos. En estos casos podrían no coincidir ambos valores (**Figura 5**).

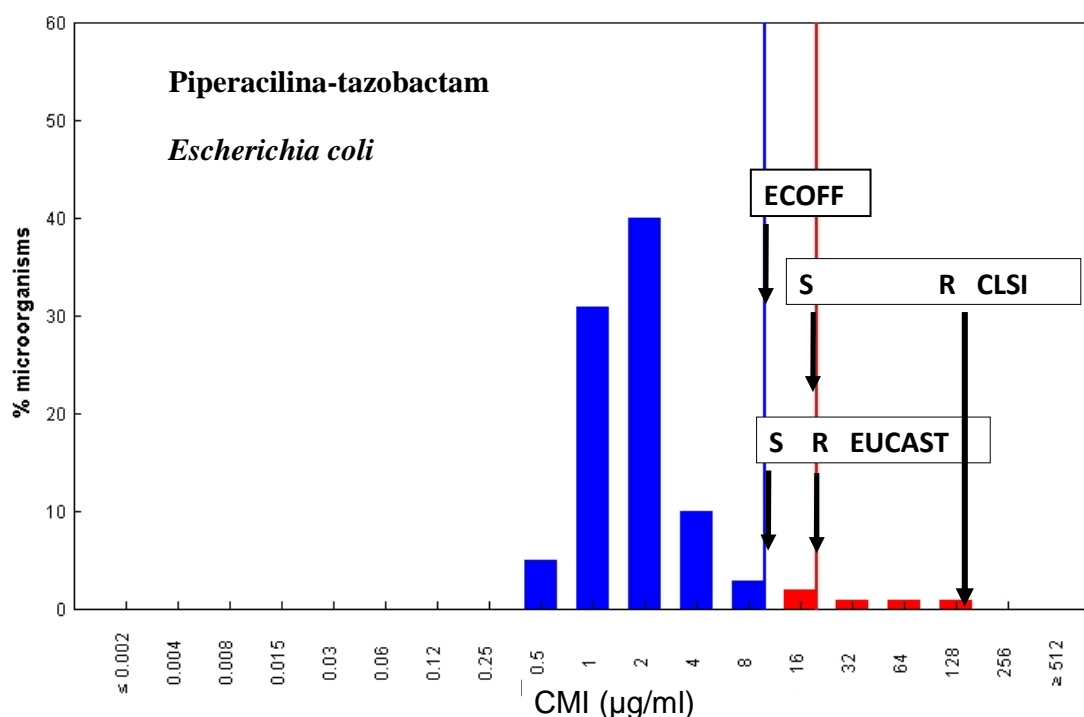


Figura 5. Distribución de CMI's a piperacilina-tazobactam en *E. coli* (<http://www.eucast.org>). Se representan los puntos de corte según CLSI y EUCAST. Según CLSI, la población bacteriana clínicamente sensible, incluye parte de la población microbiológicamente resistente y la población sensible. En cambio, para EUCAST, la población sensible incluye únicamente la población sensible y coincide con el valor ECOFF.

Es importante resaltar el significado de varios conceptos relacionados con la farmacocinética que pueden ser muy valorados a la hora de poder predecir y evitar el desarrollo de resistencias (**figura 6**):

- MPC (*mutant prevention concentration*): es una concentración de antimicrobiano por encima de la CMI que restringe la emergencia de una subpoblación de mutantes resistentes dentro de una población sensible.
- MSW (*mutant selection window*): rango de concentraciones entre la CMI y el MPC entre las que se pueden seleccionar bacterias resistentes bajo la exposición antimicrobiana.

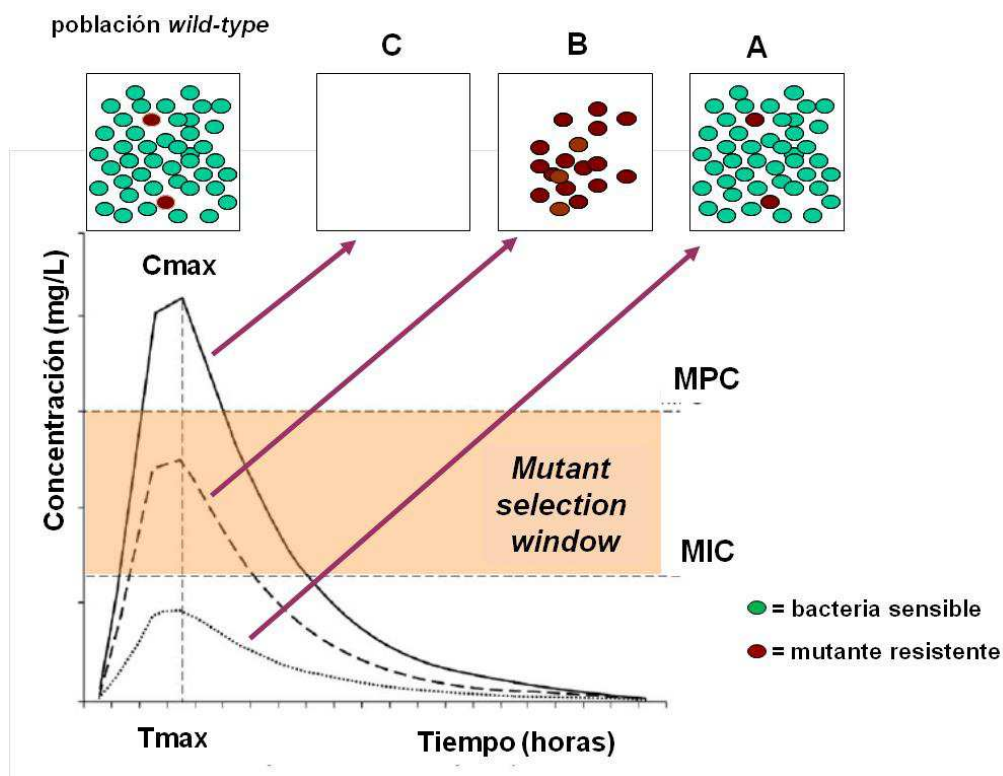


Figura
6.

Representación gráfica de los conceptos de MSW y MPC. Se reflejan tres situaciones diferentes cuando se administra un antibiótico. Las curvas representan la farmacocinética del antimicrobiano (concentración del antibiótico a lo largo del tiempo) y en los recuadros la población bacteriana. (A) La curva farmacocinética está por debajo de la CMI, por lo tanto no se espera que se produzca la selección de subpoblación resistente. (B) La curva farmacocinética está dentro de la ventana de selección de mutantes (MSW), de modo que puede seleccionarse la subpoblación resistente. (C) La curva farmacocinética sobrepasa el MPC y como consecuencia se impide la selección población sensible o resistente.

En resumen, teniendo en cuenta todas las ideas anteriormente mencionadas, se deberían tomar una serie de precauciones a la hora de poner un tratamiento antimicrobiano para prevenir la aparición de resistencias ⁽⁴⁶⁾:

- Establecer un tratamiento precoz para prevenir un aumento en la población bacteriana que implique una probabilidad aumentada de aparición de mutantes con sensibilidad disminuida dentro de la población.
- Conseguir una concentración de antimicrobiano en el sitio de acción igual o superior al MPC, para inhibir el total de la población, tanto sensible como la posible subpoblación

resistente. Esto a veces no es posible debido a los efectos secundarios de la sobredosificación del tratamiento antibiótico.

- Durante el tratamiento antimicrobiano, no utilizar las concentraciones antibióticas dentro de MSW para evitar la selección de subpoblaciones resistentes, y si se da el caso, disminuir el tiempo en que dichas concentraciones estén presentes.
- Prevenir la utilización de concentraciones subinhibitorias en el foco de infección.

3.2. Predicción *in vitro* sobre aparición de nuevas variantes moleculares con mayor espectro de actividad.

a) Pases seriados en condiciones de laboratorio.

Los experimentos de pases seriados en concentraciones crecientes del antimicrobiano a estudiar, son actualmente muy utilizados para valorar la aparición de resistencias ⁽¹⁴⁷⁾. Mediante este tipo de aproximaciones, se pueden detectar los genes en los que determinadas mutaciones pueden conferir resistencia. Nuestro grupo tiene experiencia en el empleo de esta metodología para predecir la capacidad adaptativa de diferentes tipos de β -lactamasas ⁽¹⁹⁾. Pero además, sobre este esquema inicial, nuestro grupo fue realizando progresivamente modificaciones que reprodujeran mejor la realidad clínica y de las poblaciones bacterianas. En el año 2000, se instauraron aproximaciones experimentales basadas en pases seriados en ambientes fluctuantes (alternando 2 tipos de antibióticos β -lactámicos) ⁽²⁸⁾. En 2001, se implementó la utilización de cepas con alta tasa de mutación (hipermutadoras) ⁽¹⁸⁰⁾, defectivas en el gen *mutS*. Este tipo de bacterias reproduce una situación natural en las poblaciones bacterianas, ya que la mayoría de las cepas hipermutadoras naturales descritas son defectivas en el gen *mutS*. Este tipo de experimentos se pueden dirigir aún más utilizando cepas hipermutadoras defectivas además, en el gen cromosómico *ampC* (útil cuando se van a estudiar el desarrollo de resistencia a antibióticos β -lactámicos) y portadoras de vectores plasmídicos que poseen un gen concreto, sobre el que se quiere estudiar la aparición de mutaciones. El plásmido se aísla de la cepa sometida a los pases seriados y se introduce en la misma cepa, pero libre de plásmido. Si aumenta su resistencia frente a ese antibiótico, probablemente, habrá emergido un nuevo variante. En esta línea experimental, en varios trabajos anteriores

realizados por nuestro grupo, se emplearon cepas hipermutadoras para facilitar la aparición de variantes BLEE en la β -lactamasa ROB-1 en *H. influenzae* y variantes resistentes a BLiBLs⁽⁹³⁾, o en β -lactamasas tipo CTX-M con espectro extendido, capaces de hidrolizar CAZ además de CTX⁽¹⁷⁷⁾.

Los estudios de pases seriados también son útiles para la selección de mutaciones compensatorias que pueden aparecer para restaurar la capacidad replicativa en bacterias que como consecuencia de una mutación previa que confería una resistencia antibiótica, pudiesen haber incurrido en un cierto coste⁽¹⁴⁷⁾. Este fenómeno ocurre con la selección de la mutación M182T en las β -lactamasas tipo TEM, que, como consecuencia de la aparición de mutaciones E104K:G238S (TEM-15), contribuye a restaurar la estabilidad del enzima (TEM-52)⁽⁴¹⁾ o bien con la mutación A77V en las β -lactamasas tipo CTX-M después de la selección de la mutación P167S⁽¹⁷⁷⁾. Sin embargo, aunque los pases seriados son útiles para determinar la probabilidad de aparición de resistencias, no son válidos para valorar su estabilidad ni su diseminación, ya que estos son procesos azarosos, difícilmente predecibles. Por ello, una vez que se han detectado, es necesario valorar su mantenimiento mediante estudios observacionales y de *fitness*. Aun así existen otras variables que no pueden ser predecibles por modelos *in vitro* como su posibilidad de captura génica y transferencia mediante EGM y su diseminación debido a determinados clones epidémicos^(147,148).

b) Mutagénesis al azar

Las estrategias de mutagénesis al azar (*random mutagenesis*) se emplean cuando se pretende obtener el mayor número de variantes posible que confieran un determinado fenotipo, sin que se pueda dirigir de alguna manera la eficacia adaptativa de tales variantes. Estas técnicas se han considerado fiables para la reproducción de la evolución natural de enzimas de tipo TEM, CTX-M y AmpC^(20,28,76,84,117,163,262). El empleo de cepas hipermutadoras permite el estudio de los efectos de mutagénesis secuencial^(84,93,117,163). Los estudios previos de LeClerc y Oliver han servido de base en esta aproximación basada en la utilización de cepas de *E.coli* hipermutadoras para predecir la aparición de cepas resistentes^(124,125,181).

Se han propuesto otros procedimientos como “ADN shuffling” o barajado de ADN; uso de fagémidos o análogos de ADN o reproducir condiciones de PCR extremas (alto contenido de Mn^{2+}) que faciliten la acumulación de errores en la DNA polimerasa). En estos casos varias mutaciones pueden aparecer simultáneamente, siendo más difícil determinar su contribución a la aparición de un fenotipo determinado ^(76,262).

c) Mutagénesis dirigida.

La estrategia de mutagénesis dirigida se emplea para identificar el efecto de una mutación específica en el fenotipo de un gen. Consiste en la incorporación de un cambio nucleotídico específico en un determinado gen, utilizando oligonucleótidos diseñados con ese fin. Esta es una técnica que permite introducir un número elevado de mutaciones de forma secuencial, pudiendo estudiar el efecto que cada nuevo cambio tiene sobre la proteína codificada.

Objetivo

El objetivo de este capítulo es el de estudiar la posibilidad de obtener variantes de CTX-M que confieran una disminución de la sensibilidad o resistencia frente a la combinación de β -lactámicos más inhibidores de β -lactamasas (BLiBL) mediante experimentos de evolución *in vitro*.

Materiales y métodos

Clonaje de los genes bla_{CTX-M} en el vector pBGS18⁻. Se establecieron dos grupos de CTX-Ms según su fenotipo de resistencia frente a CTX y a CTX + CAZ. En el primer grupo (CTX^RCAZ^S) se encuentran CTX-M-1, CTX-M-3 y CTX-M-10, del grupo de CTX-M-1; CTX-M-9 y CTX-M-14 del grupo de CTX-M-9 y CTX-M-2 del grupo de CTX-M-2. El segundo grupo (CTX^RCAZ^R) a su vez fue subdividido según el tipo de mutación causante de la resistencia a CAZ: i) Aquellas variantes CTX-M con el cambio D240G: CTX-M-32, CTX-M-15, CTX-M-27 y CTX-M-43-like (los genes *bla* correspondientes fueron contruidos mediante mutagénesis dirigida de $bla_{CTX-M-1}$, $bla_{CTX-M-3}$, $bla_{CTX-M-14}$ y $bla_{CTX-M-2}$, respectivamente) y ii) las variantes con el cambio P167S: CTX-M-58, CTX-M-62, CTX-M-19 y CTX-M-35 (derivados mediante mutagénesis dirigida de $bla_{CTX-M-1}$, $bla_{CTX-M-3}$, $bla_{CTX-M-14}$ y $bla_{CTX-M-2}$, respectivamente).

Los genes correspondientes a las β -lactamasas seleccionadas ($bla_{CTX-M-1}$, $bla_{CTX-M-3}$, $bla_{CTX-M-10}$, $bla_{CTX-M-15}$, $bla_{CTX-M-32}$, $bla_{CTX-M-58}$, $bla_{CTX-M-62}$, $bla_{CTX-M-2}$, $bla_{CTX-M-43-like}$, $bla_{CTX-M-35}$, $bla_{CTX-M-9}$, $bla_{CTX-M-14}$, $bla_{CTX-M-27}$ y $bla_{CTX-M-19}$) fueron clonados en el vector pBGS18⁻ (que posee el determinante de resistencia a kanamicina, *aph3'*)⁽²³⁹⁾ utilizando sitios de restricción para las enzimas *EcoRI* y *PstI* [grupo de la CTX-M-1,⁽¹⁷⁷⁾] o *EcoRI* y *BamHI* (grupos CTX-M-2, -9) (**tabla 4**). Finalmente los plásmidos resultantes fueron transformados mediante la técnica de cloruro de calcio^(71,101) en *E. coli* MI1443, una cepa normomutadora $\Delta ampC$ ⁽⁵⁸⁾ y en *E. coli* GB20, su derivada isogénica hipermutadora, resultante de la inserción del transposón *Tn10* (que porta el determinante de resistencia a tetraciclina) en el gen *mutS*, inactivándolo ($\Delta ampC$, *mutS::Tn10*)⁽⁹³⁾.

TABLA 4. Cebadores utilizados en este estudio. Los sitios de restricción *EcoRI* y *BamHI* están subrayados en las secuencias de CTX-M-EcoRI-Fw y CTX-M-BamHI-Rv. Estos cebadores no incluyen las regiones promotoras.

Cebadores	CTX-M	Secuencia nucleotídica (5'-3')
CTX-M-14_EcoRI-Fw	---	GGAATT <u>CGA</u> ATACTGATGTAACACGGATT
CTX-M-14_BamHI-Rv	---	CGGGATCCTTACAGCCCTTCGGCGATGA
CTX-M-2_EcoRI-Fw	---	GGAATTCACTTGAAGGCCGAGGGATAA
CTX-M-2_BamHI-Rv	---	CGGGATCCCGCTCCATTATTGCATCAGA
CTX-M-2_P167S_F	CTX-M-35	AACCGAGTCCACGCTCAATA
CTX-M-2_P167S_R	CTX-M-35	TGAGCGTGGACTCGGTTCT
CTX-M-2_D240G_F	CTX-M-43-like	AACCGGCAGCGGAGGTTATG
CTX-M-2_D240G_R	CTX-M-43-like	AACCTCCGCTGCCGGTTTTAT
CTX-M-14_P167S_F	CTX-M-19	ATCGCACTGAATCTACGCTGAATA
CTX-M-14_P167S_R	CTX-M-19	ATTCAGCGTAGATTCAAGTGCAT
CTX-M-14_D240G_F	CTX-M-27	GCGGCTACGGCACCACCAAT
CTX-M-14_D240G_R	CTX-M-27	TAGCCGCCGCTGCCGGTCTT

Pases seriados en concentraciones crecientes de amoxicina-clavulánico (AMC). Para llevar a cabo los experimentos de pases seriados, se utilizaron placas de 96 pocillos con capacidad de 2 ml de volumen total, lo que permitió manejar un número elevado de muestras al mismo tiempo (Deepwell plate®, Eppendorff, Hamburg, Germany). En cada fila de la placa, fueron inoculados doce clones independientes de *E.coli* GB20 portadora de pBGS18⁻ con cada uno de los diferentes genes *bla*_{CTX-M} descritos anteriormente. Cada día de experimento se inocularon 18 µl de cada pocillo en una placa con medio nuevo, suplementado con tetraciclina (20 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml) y concentraciones crecientes de AMC empezando por una concentración dos veces más baja que el valor de CMI original y con incrementos del doble, desde 1 a 128 µg/ml de amoxicilina y manteniendo fija la concentración de clavulánico a 2 µg/ml. Las placas se incubaron 24 horas a 37°C con agitación a 180 rpm.en medio LB. Una vez alcanzada esta concentración, se siguieron

realizando los pases seriados incrementando la concentración de clavulánico al doble y dejando fija la de amoxicilina hasta alcanzar 128/64 $\mu\text{g/ml}$. Se eligieron 4 pocillos que habían crecido, correspondientes a cada tipo de β -lactamasas a 64/2 y 128/8 $\mu\text{g/ml}$ de AMC, excepto para *bla*_{CTX-M-1} que fue analizada también a 128/64 $\mu\text{g/ml}$, y se extrajo el contenido plasmídico con el kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen, GmbH, Hilden, Germany). Los plásmidos se transformaron en *E.coli* MI1443 seleccionando con kanamicina (50 $\mu\text{g/ml}$) y AMC a una concentración dos veces la CMI original. Después de esta primera transformación, se eligieron 3 clones portadores de cada CTX-M para extraer de nuevo el plásmido y volverlo a introducir en MI1443 seleccionando únicamente con kanamicina, con el objetivo de confirmar que el incremento en la CMI era debido a mutaciones en el gen *bla*_{CTX-M} y no a alteraciones cromosómicas que condujeran a cambios en la permeabilidad de membrana. Se obtuvieron en total 24 clones extraídos de cada concentración (64/2 y 128/8 $\mu\text{g/m}$), excepto para la concentración de 128/64, que fue analizada sólo en el caso de *bla*_{CTX-M-1} y para la que se obtuvieron 12 clones.

Las CMIs de estos clones frente a BLiBLs fueron analizadas, y sólo en los casos en los que se observó un incremento de la CMI original se llevó a cabo una secuenciación de los genes *bla*_{CTX-M} completos. Para descartar que el incremento de las CMIs fuera debido a un aumento en el número de copias del plásmido (y como consecuencia en el nivel de expresión del gen, efecto de dosis génica), se procedió a digerir de nuevo con *EcoRI* y *BamHI* para reclonar en un vector pBGS18⁻ nuevo obtenido de una cepa de *E. coli* no expuesta a β -lactámicos. Todas las construcciones fueron retransformadas en MI1443 y las CMIs frente a BLiBLs y β -lactámicos fueron reanalizadas.

Una vez caracterizados los variantes con CMI incrementada frente a BLiBL (*IR-CTX-M*, *Inhibitor Resistant-CTX-M*), éstos fueron sometidos a nuevos ensayos de pases seriados para intentar restaurar la actividad perdida frente a oximino-cephalosporinas observada al adquirir el fenotipo *IR-CTX-M* (antagonismo pleiotrópico). Con este objetivo, se realizaron experimentos de pases seriados en concentraciones crecientes de CTX, comenzando dos veces por debajo de la CMI de los mutantes *IR-CTX-M* (0.012-196 $\mu\text{g/ml}$). Se añadió AMC a concentración fija, correspondiente a dos veces por debajo del valor de la CMI de cada variante *IR-CTX-M*, y la tetraciclina y kanamicina también se añadieron en concentraciones

fijas (20 y 50 µg/ml, respectivamente). La metodología de pases seriados, identificación y caracterización de los clones capaces de crecer a las mayores concentraciones de CTX se realizó como se describió anteriormente para la caracterización de los mutantes con fenotipo *IR*-CTX-M.

Estudio de la sensibilidad antibiótica: se analizaron para *E. coli* MI1443 portadora de los genes *bla*_{CTX-M} originales y mutados las CMI's frente a BLiBLs, cefalosporinas y carbapenems utilizando tiras de E-test (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Los valores obtenidos fueron el valor medio de dos determinaciones independientes. Los antibióticos utilizados fueron CX), CTX, FEP, CAZ, IMP, AMC y PTZ. Las cepas de referencia utilizadas como controles fueron ATCC 25922, ATCC 35218 y ATCC 27853.

La solución stock de ácido clavulánico se almacenó siempre a -80°C en alícuotas de 1.4 ml para evitar reutilizarla. Para asegurar su eficiencia durante los pases seriados, se realizó la técnica de macrodilución en líquido en presencia de AMC en proporción 2:1 varias veces durante los experimentos de evolución utilizando la cepa de referencia ATCC 35218.

Resultados

Experimentos de evolución de genes bla_{CTX-M} con fenotipo $CTX^R CAZ^S$ en concentraciones crecientes de AMC. Doce clones de *E. coli* GB20 portador del plásmido pBGS18⁻ con cada uno de los genes bla_{CTX-M} pertenecientes al grupo $CTX^R CAZ^S$ incluidos en este estudio ($bla_{CTX-M-1}$, $bla_{CTX-M-3}$, $bla_{CTX-M-10}$, $bla_{CTX-M-9}$, $bla_{CTX-M-14}$ y $bla_{CTX-M-2}$) fueron sometidos a pases seriados en concentraciones crecientes de AMC (ver Material y Métodos). Se obtuvieron tres tipos de mutantes diferentes.

El primero presentó la sustitución única de serina por glicina en la posición 130 (S130G), debido al cambio nucleotídico $A^{397} \rightarrow G^{397}$. Esta mutación se obtuvo en todas las concentraciones estudiadas y en todas las enzimas CTX-M, excepto en CTX-M-2. Este cambio fue seleccionado en el 93.5% de los ensayos con CTX-M-1, 86.9% de CTX-M-3, en el 100% de CTX-M-10 y de CTX-M-9 y en el 53.8% de CTX-M-14. En todos los casos se observó un fenotipo similar, con incremento en la resistencia a AMC (de 2 a 6 veces la CMI original) y a PTZ (de 4 a 96 veces la CMI original) y una disminución bastante marcada de la resistencia a todas las cefalosporinas analizadas (**tabla 5**). Los derivados del grupo de CTX-M-1 mostraron los valores más altos de CMIs frente a BLiBL (CTX-M-1_{S130G}, CTX-M-3_{S130G} y CTX-M-10_{S130G}).

El segundo mutante presentó la sustitución única de lisina por arginina en la posición 234 (K234R), debido al cambio nucleotídico $A^{710} \rightarrow G^{710}$, y se encontró únicamente en clones portadores de $bla_{CTX-M-14}$. Este cambio se obtuvo en un 46.2% de los clones evolucionados a las concentraciones 128/8 and 64/2 µg/ml of AMC. En estos mutantes se observó un incremento de 2 veces la CMI original frente a AMC y PTZ (**tabla 5**) y como en el caso anterior, se asoció a un incremento en la susceptibilidad frente a cefalosporinas, excepto para FEP (192, 11 y 2 veces más sensibles frente a CTX, CXM y CAZ, respectivamente). Este efecto de antagonismo pleiotrópico fue menos marcado que en el caso de los mutantes que mostraron el cambio S130G.

El tercer mutante fue el resultado de una sola variación nucleotídica ($A^{718} \rightarrow G^{718}$) responsable del cambio aminoacídico de serina por glicina en la posición 237. Este mutante S237G se detectó en variantes de las enzimas CTX-M-1 y CTX-M-3 (6.5% y 13.1%

respectivamente) a la concentración de 64/2 µg/ml de AMC y mostró un discreto incremento (2 veces la CMI original) sin efecto en los niveles de resistencia frente a PTZ (**tabla 5**). De la misma manera no se vieron afectados los valores de CMIs frente a CTX, CAZ o CXM, aunque se observó una pequeña reducción de la actividad enzimática frente a FEP (4 veces por debajo de la CMI original), pero menos marcada que en el caso de mutantes S130G.

Todos los cambios nucleotídicos observados respondieron a transiciones nucleotídicas (cambio de purina por purina o pirimidina por pirimidina), como era más previsible al usar una cepa hipermutadora defectiva en MutS, ya que esta proteína del sistema de reparación de errores en el ADN (*mismatch repair*, MMR) de *E.coli*, tiende a corregir fundamentalmente este tipo de errores de replicación ⁽¹⁰⁵⁾. Si bien solo pudieron localizarse cambios entre bases púricas A por G, no se detectó ningún mutante resultado de transiciones pirimidínicas.

TABLA 5. Susceptibilidad frente a β -lactámicos de la cepa de *E.coli* MI1443 portadora de las variantes de CTX-M resistentes a inhibidores con fenotipo CTX^RCAZ^S.

CTX-M original	Mutante ^a	Obtención (%)	CMI (μg/ml) de los antibióticos β -lactámicos ^b						
			AMC ^c	PTZ ^d	CTX	CAZ	FEP	CXM	IMP
CTX-M-1			4	1	≥256	3	24	≥256	0,25
	CTX-M-1 _{S130G}	93,5	12	96	0,023	0,19	0,023	2	0,19
	CTX-M-1 _{S237G}	6,5	8	1,5	≥256	4	6	≥256	0,25
CTX-M-3			2	1	24	1	3	≥256	0,25
	CTX-M-3 _{S130G}	86,9	12	12	0,023	0,125	0,023	2	0,19
	CTX-M-3 _{S237G}	13,1	4	1,5	16	1,5	1	≥256	0,19
CTX-M-10			2	1	16	0,38	0,5	≥256	0,125
	CTX-M-10 _{S130G}	100	12	64	0,032	0,19	0,047	4	0,25
CTX-M-9			3	1	12	0,75	0,5	≥256	0,19
	CTX-M-9 _{S130G}	100	8	4	0,032	0,25	0,064	2	0,19
CTX-M-14			3	0,75	48	0,38	1	≥256	0,19
	CTX-M-14 _{S130G}	53,8	6	4	0,032	0,19	0,023	2	0,25
	CTX-M-14 _{K234R}	46,2	6	1,5	0,25	0,25	1	24	0,19
MI1443 (pBGS18) ^e			1,5	1	0,032	0,25	0,023	3	0,19

^amutantes CTX-M obtenidos en los experimentos de evolución *in vitro*. ^bValores de CMIs determinados mediante tiras de E-test. ^cLa AMC se utilizó en proporción 2:1. ^dEl tazobactam se usó en concentración fija a 4 μg/ml. ^eLa cepa de laboratorio MI1443 portadora del plásmido pBGS18 sin gen *bla*_{CTX-M}.

Experimentos de evolución de genes bla_{CTX-M} con fenotipo $CTX^R CAZ^R$ en concentraciones crecientes de AMC. Se conocen dos tipos de cambios aminoacídicos implicados en un incremento de la actividad hidrolítica frente a CAZ en β -lactamasas del grupo CTX-M, las sustituciones D240G y P167S/T/Q ^(30,178). Dentro de este estudio, entre los β -lactamasas portadoras del cambio D240G (CTX-M-32, CTX-M-15, CTX-M-27, y CTX-M-43-like), los variantes *IR*-CTX-M con sensibilidad disminuida a BLiBLs sólo presentaron la mutación S130G. En cambio, entre los variantes *IR*-CTX-M evolucionados a partir de β -lactamasas con el cambio P167S (CTX-M-58, CTX-M-62, CTX-M-19, y CTX-M-35), se encontraron las mutaciones S130G y K234R.

Entre los mutantes S130G se observó un incremento en la CMI_{AMC} de 3-5 veces respecto a la CMI original y de 2-12 veces la CMI_{PTZ} . Igual que ocurría con los variantes evolucionados AMC-resistentes con fenotipo $CTX^R CAZ^S$, se detectó una gran reducción en las CMIs para todas las cefalosporinas estudiadas, excepto en CTX-M-58_{S130G} (β -lactamasas derivada de CTX-M-1 con el cambio P167S), que mostró resistencia a cefalosporinas y BLiBL simultáneamente (**tabla 6**), siendo esta reducción algo más acusada cuando las variantes presentan el cambio D240G (correspondiente a CTX-M-32).

Las variantes evolucionadas con el cambio K234R mostraron un incremento de 2.7-5.3 veces la CMI_{AMC} original. Por el contrario, para PTZ, este incremento fue prácticamente nulo (1.5 veces). El mutante CTX-M-62_{K234R} reflejó un incremento en la CMI_{CAZ} de 2.7 veces y de 3 veces en la CMI_{FEP} . Por otra parte no se encontraron variaciones en los valores de CMIs frente a CTX o CXM, contrariamente a lo que ocurre con los mutantes S130G. Hay que subrayar también el caso del mutante CTX-M-58_{K234R}, que aún confiriendo altos valores de CMI frente a AMC, mantuvo la actividad frente a CAZ, por lo que al igual que CTX-M-58_{S130G}, que confirió un fenotipo de resistencia a cefalosporinas y a BLiBL.

TABLA 6. Susceptibilidad frente a β -lactámicos de la cepa de *E.coli* MI1443 portadora de las variantes de CTX-M resistentes a inhibidores con fenotipo CTX^RCAZ^R.

variante CTX-M natural	CTX-M original ^a	Mutante ^b	Obtención (%)	CMIs (µg/ml) de los antibióticos β-lactámicos ^c						
				AMC ^d	PTZ ^e	CTX	CAZ	FEP	CXM	IMP
CTX-M-32	CTX-M-1 (D240G)			1,5	0,75	48	2	1,5	≥256	0,25
		CTX-M-32 _{S130G}	100	6	4	0,023	0,125	0,032	2	0,12
CTX-M-15	CTX-M-3 (D240G)			1,5	1	32	1,5-2	1	≥256	0,25
		CTX-M-15 _{S130G}	100	8	8	0,032	0,019	0,032	2	0,19
CTX-M-27	CTX-M-14 (D240G)			1,5	1	≥256	4	4	≥256	0,25
		CTX-M-27 _{S130G}	100	6	2	0,032	0,19	0,032	2	0,25
CTX-M-43-like ^f	CTX-M-2 (D240G)			1,5	0,75	≥256	2	6	≥256	0,25
		CTX-M-43-like _{S130G}	100	6	2	0,032	0,19	0,032	2	0,25
CTX-M-58	CTX-M-1 (P167S)			3	1	4	96	3-4	≥256	0,25
		CTX-M-58 _{S130G}	63,3	8	12	0,064	24	1,5	2	0,25
		CTX-M-58 _{K234R}	36,7	8	1	2	64	1	24	0,25
CTX-M-62	CTX-M-3 (P167S)			1,5	1	1,5	12	0,5	32	0,19
		CTX-M-62 _{K234R}	100	8	1,5	2	32	1,5	32	0,25
CTX-M-19	CTX-M-14 (P167S)			2	0,75	2	6-8	0,75	64	0,25
		CTX-M-19 _{S130G}	100	8	3	0,032	3	0,125	2	0,19
CTX-M-35	CTX-M-2 (P167S)			2	1	1,5	12	0,25	48	0,19
		CTX-M-35 _{S130G}	100	6	3	0,032	3	0,064	2	0,19
MI1443 (pBGS18) ^g				1,5	1	0,032	0,25	0,023	3	0,19

^aEnzimas CTX-Ms originales y entre parentesis la mutación involucrada en la resistencia a CAZ; ^bmutantes CTX-M obtenidos en los experimentos de evolución *in vitro*; ^cCMIs obtenidas con tiras de E-test; ^fCTX-M-2_{D240G} no está descrito, este variante se creó para este trabajo y se denominó CTX-M-43-like y se diferencia de CTX-M-43 en que tiene una serina en la posición 274, en vez de una arginina.

Experimentos de evolución de genes bla_{CTX-M} resistentes a BLiBL en concentraciones crecientes de CTX. Como se ha referido en los experimentos anteriores, cuando aparecen mutaciones en los genes bla_{CTX-M} que confieren incrementos en las CMI_s frente a BLiBLs, es frecuente la emergencia de antagonismo pleiotrópico frente a cefalosporinas, quedando su resistencia parcial o totalmente anulada. Para restaurar la resistencia frente a CTX, se realizaron experimentos de pases seriados como se describe en Materiales y Métodos. Las concentraciones estudiadas fueron: 0.192 y 0.384 µg/ml para los variantes IR-CTX-M portadores de la mutación S130G; 3 y 25 µg/ml cuando el cambio fue K234R y por último, 49 y 196 µg/ml para los variantes con la mutación S237G. En total se analizaron 40 clones de *E. coli* GB20 portadora de los genes bla_{CTX-M} con la mutación S130G (8 para cada uno: CTX-M-1_{S130G}, CTX-M-3_{S130G}, CTX-M-10_{S130G}, CTX-M-9_{S130G} y CTX-M-14_{S130G}).

Se obtuvieron dos tipos de mutantes, el primero de ellos presentó una reversión al genotipo original, G130S (33%) y el segundo desarrolló una segunda mutación (67%) que le permitió crecer a una concentración alta de CTX. La restauración de la resistencia a CTX fue el resultado del cambio nucleotídico T⁵¹⁵→C⁵¹⁵, que confiere la mutación adicional L169S en el variante S130G resistente a BLiBLs, y se encontró únicamente en CTX-M-10. Se trata del primer caso observado en este trabajo de una transición nucleotídica entre bases pirimidínicas. El fenotipo resultante mostró un incremento en la CMI_{CTX} de 5.94 veces, 3.95 veces la CMI_{CAZ} y 2 veces la CMI_{FEP}, respecto al variante CTX-M-10_{S130G}. Aunque la CMI frente a AMC no se vio afectada, para la PTZ la CMI disminuyó 5.3 veces.

En el caso de los variantes con la mutación K234R (sólo CTX-M-14_{K234R}, del que se analizaron también 8 clones evolucionados en presencia de CTX), se detectó en todos los casos una reversión al genotipo original, R234K, no encontrándose en este caso una segunda mutación que restaurase la resistencia a CTX.

Por último, para los variantes con el cambio S237G (CTX-M-1_{S237G} y CTX-M-3_{S237G}), no se encontraron ni mutaciones adicionales ni reversiones en ninguno de los casos.

Discusión

En este trabajo se detectaron tres tipos de mutantes en ensayos de evolución *in vitro* llevados a cabo mediante pases seriados en presencia de concentraciones crecientes de AMC. La primera mutación, S130G, ha sido previamente descrita en aislados clínicos portadores de BLEE de tipo SHV (SHV-10)⁽²⁰⁹⁾, de tipo TEM (como por ejemplo TEM-59, TEM-76, TEM-89)^(26,127,172) y en IRKO-1, una enzima derivada de OXY-2⁽²³³⁾. Esta mutación también se ha detectado en condiciones de laboratorio en la β -lactamasa ROB-1 resistente a BLiBLs⁽⁹³⁾ y en CTX-M-9 en experimentos de mutagénesis dirigida⁽¹³⁾. De la misma manera en que ha sido observado en este trabajo, todas estas variantes descritas anteriormente presentaron una reducción de la susceptibilidad frente a BLiBLs (AMC y PTZ) y un descenso en la resistencia frente a cefalosporinas (antagonismo pleiotrópico). Se observaron algunas diferencias entre las CTX-M de las diferentes familias en cuanto a la eficiencia enzimática frente a AMC y PTZ. Así por ejemplo, se observaron CMIs mayores frente a AMC que a PTZ en variantes CTX^RCAZ^S del grupo de CTX-M-9 y en todas las variantes CTX^RCAZ^R, excepto en CTX-M-58_{S130G}. Por otro lado, se observaron CMIs más elevadas a PTZ en variantes CTX^RCAZ^S del grupo de CTX-M-1 y en CTX-M-58_{S130G}.

La segunda mutación identificada fue K234R, descrita previamente en BLEE de tipo SHV [SHV-56, SHV-72 y SHV-84^(81,143,156)] con una reducción del efecto inhibitor del ácido clavulánico. En otras β -lactamasas el efecto de este cambio no está del todo claro. En TEM-1, mediante mutagénesis dirigida se demostró que este cambio no tiene ningún efecto sobre BLiBLs⁽¹²⁸⁾. Más aún, este cambio es común en carbapenemasas que permanecen susceptibles a BLiBLs⁽³⁹⁾. Por último, en concordancia con los resultados de trabajos anteriores, las variantes IR-CTX-M portadoras de la mutación K234R tienen un efecto muy discreto frente a PTZ.

El tercer mutante presentó el cambio S237G, no descrito previamente en otras β -lactamasas. En un trabajo reciente se ha obtenido una variante de CTX-M-15 con un cambio aminoacídico en la posición 237, al realizar experimentos de selección con la combinación ceftarolina y avibactam (inhibidor conocido como NXL104) que también presenta un efecto de antagonismo pleiotrópico⁽¹³⁵⁾. La mutación S237G se detectó en dos variantes pertenecientes al grupo de CTX-M-1 y no presentó aumentos en la resistencia frente a

BLiBLs significativo (2 veces la CMI original). Este residuo tiene un papel importante en la discriminación de inhibidores de β -lactamasas en CTX-M-4⁽⁹⁵⁾ y en KPC-2⁽¹⁹¹⁾, así, cuando la serina de la posición 237 es sustituida por alanina, se observa un incremento de 2 veces la CMI original de AMC.

En otros estudios se ha sugerido que la posición R276 en enzimas CTX-M es equivalente a R244 en β -lactamasas de tipo TEM, cuyos cambios están involucrados en la resistencia a inhibidores⁽²⁴⁰⁾. En este trabajo no se ha encontrado ninguna sustitución en esta posición, sugiriendo que en β -lactamasas de tipo CTX-M, este cambio no está relacionado con la resistencia a BLiBLs⁽¹⁹⁴⁾.

Si nos fijamos en las recomendaciones de EUCAST en cuanto a los puntos de corte, los variantes obtenidos en este trabajo con las mutaciones K234R y S237G no serían clasificados como resistentes únicamente por este mecanismo. Solo se detectarían como resistentes si además contaran con algún otro mecanismo de resistencia, como por ejemplo la pérdida de porinas de membrana. Únicamente los variantes del grupo CTX^RCAZ^S CTX-M-1 con el cambio S130G podrían ser categorizados como resistentes a BLiBLs según el criterio de EUCAST. Ninguno de los mutantes obtenidos podría haber sido categorizado como resistente a BLiBLs según las recomendaciones de CLSI.

Análogamente a lo que ocurre con las variantes de TEM resistentes a BLiBLs (IRTs), todos los variantes IR-CTX-M obtenidos en este trabajo presentaron un antagonismo pleiotrópico entre la resistencia a inhibidores y la resistencia a oximino-cefalosporinas, especialmente en los mutantes con el cambio S130G. Recientemente se han descrito en aislados clínicos β -lactamasas de tipo TEM con fenotipo de BLEE y simultáneamente resistentes a inhibidores, y se han denominado CMT (*complex mutant TEM*)⁽⁴⁷⁾. Al menos se han identificado 3 aislados clínicos con β -lactamasas tipo GES que confieren simultáneamente resistencia a BLiBLs y a CTX debido a que presentan las mutaciones G170S y E104K^(15,121,205). Los únicos mutantes obtenidos en este estudio que tienen las CMIs más elevadas frente a inhibidores y a cefalosporinas simultáneamente son CTX-M-1_{S237G} (CMI_{AMC}: 8 μ g/ml; CMI_{CTX}: ≥ 256 μ g/ml), CTX-M-58_{S130G} (CMI_{AMC}: 8 μ g/ml; CMI_{PTZ}: 12 μ g/ml; CMI_{CAZ}: 24 μ g/ml), CTX-M-58_{K234R} (CMI_{AMC}: 8 μ g/ml; CMI_{CAZ}: 64 μ g/ml) y CTX-M-62_{K234R} (CMI_{AMC}: 8 μ g/ml; CMI_{CAZ}: 32 μ g/ml), que aunque no son estrictamente

resistentes (tendrían que tener una $CMI_{AMC} > 8\mu\text{g/ml}$ para serlo), combinados con algún otro mecanismo de resistencia se identificarían como *Complex Mutant*-CTX-M (*CM*-CTX-M) conforme a los criterios de EUCAST ⁽²¹⁴⁾.

Los resultados de este trabajo indican que la restauración de la actividad hidrolítica frente a las cefalosporinas en mutantes *IR*-CTX-M, sucede con una probabilidad baja. De 64 experimentos de evolución, únicamente el variante CTX-M-10 con la mutación S130G, fue capaz de restaurar parcialmente la resistencia frente a CTX y CAZ adquiriendo adicionalmente la mutación L169S. En este doble mutante S130G + L169S, se observó un incremento de 5.9 veces la CMI frente a CTX. Cambios en esta posición han sido descritos en variantes de CTX-M-25 con el cambio único L169Q con actividad reducida frente a CTX, pero incrementada frente a CAZ, comparada con su variante isogénica ⁽⁷⁸⁾. En OXA-32 el cambio L169I confiere aumentos en la CMI frente a CAZ pero no frente a CTX, y en la β -lactamasa ROB-1 que proporciona incrementos en la actividad frente a CTX y CAZ ⁽⁹³⁾. En un trabajo previo de nuestro grupo se observó como en β -lactamasas del grupo CTX-M-1 que adquirieron previamente la mutación P167S para incrementar la capacidad de hidrolizar ceftazidima, el cambio A77V podía restaurar la pérdida de estabilidad del *loop* omega producida por el cambio P167S ⁽²⁰²⁾. Ahora demostramos como el cambio L169S en CTX-M, compensa parcialmente el antagonismo pleiotrópico observado con la mutación previa S130G, por lo tanto la mutación L169S es una mutación compensatoria en β -lactamasas del grupo CTX-M. Si bien este doble mutante no llega a considerarse *CM*-CTX-M según los criterios de CLSI y EUCAST, si permite especular que existen posiciones que podrían jugar un papel clave para desarrollar un fenotipo *CM*-CTX-M. Probablemente ensayos sucesivos de enriquecimiento como el modelo propuesto en esta Tesis, permitirían conocer el combinado de mutaciones que podrían dar como resultado un verdadero fenotipo *CM*-CTX-M, extrapolable a otras β -lactamasas que aunque identificadas como *Complex-Mutants* por su genotipo, realmente presentan un fenotipo BLEE o IR ⁽²³⁴⁾.

Aunque sabemos que la coselección de varias β -lactamasas en un mismo clon puede conferir un fenotipo de resistencia complejo frente a antibióticos β -lactámicos, una sugerencia atractiva sería la administración simultánea de cefalosporinas y BLiBLs como estrategia preventiva para dificultar la aparición de resistencias frente a ambos grupos de

antibióticos. Otro aspecto importante que hay que tener en cuenta es que se están describiendo asociaciones entre enzimas de tipo CTX-M y carbapenemasas como VIM-1⁽¹⁶⁰⁾, KPC-2⁽⁵³⁾ u OXA-48^(67,196), teniendo constancia además de la diseminación por Europa de un complejo clonal (ST395) portador de CTX-M-15 y OXA-48⁽²⁰⁷⁾. Este hecho nos hace pensar en que las enzimas de tipo CTX-M persistirán dentro de las poblaciones bacterianas debido a una coselección con las enzimas carbapenemasas que están emergiendo. Por ello es de vital importancia avanzar en la fabricación de nuevos fármacos que puedan hacer frente a posibles futuras pandemias causadas por estos microorganismos, resistentes a los antimicrobianos más empleados en clínica, las combinaciones de BLiBLs y los carbapenémicos.

En relación a esta idea, se han realizado diferentes estudios en los últimos años: producción de inhibidores de β -lactamasas que no contengan un anillo β -lactámico en su estructura, para no ser inhibidos por estas enzimas, a diferencia de los inhibidores utilizados hasta el momento (clavulánico, tazobactam y sulbactam)⁽⁸⁵⁾, modelizaciones moleculares y comparaciones *in silico* de las eficacias de los inhibidores clásicos y los nuevos mediante estudios de acoplamiento en diferentes β -lactamasas⁽⁷²⁾ y modificaciones en la estructura de estos inhibidores para mejorar más de 200 veces su eficacia⁽¹⁷⁴⁾. Se están empleando combinaciones de cefalosporinas con estos nuevos inhibidores (concretamente la ceftarolina y el inhibidor no β -lactámico NXL104 o avibactam) para diferentes análisis, entre otros: en cepas productoras de diferentes β -lactamasas, estudios farmacodinámicos⁽¹⁴¹⁾ y del riesgo de aparición de mutaciones que confieran resistencia frente a esta combinación de compuestos⁽¹³⁵⁾, además de estudios para averiguar la concentración de inhibidor necesaria para proteger a la ceftarolina de la acción de las β -lactamasas⁽¹⁶⁵⁾.

Cabría pensar, que los fenotipos mostrados por estas variantes *IR*-CTX-M y *CM*-CTX-M podrían confundirse con el de β -lactamasas o β -lactamasas resistentes a inhibidores (IRT por ejemplo), siendo su falta de detección más bien un problema metodológico que una ausencia en las cepas clínicas⁽¹⁹⁹⁾ (desarrollado en el capítulo 2 de esta Tesis).

Creemos que el presente trabajo es un buen ejemplo del tipo de investigación necesario para predecir el desarrollo de resistencias mediante presión antibiótica y, que complementado con otro tipo de estudios clínicos, podría contribuir a predecir y

probablemtente a prevenir la diseminación de resistencias mediante buenas políticas adecuadas de uso y control de fármacos ⁽¹⁴⁸⁾.

CAPÍTULO 2.

Detección de variantes genéticas de las β -lactamasas CTX-M con fenotipos de resistencia a BLiBLs en *E. coli*: enmascaramiento con otros mecanismos de resistencia.

Introducción

Como se describe en el capítulo 1 de esta Tesis Doctoral, la selección de variantes CTX-M con resistencia a la combinación de un β -lactámico mas un inhibidor de β -lactamasas (BLiBL) es fácil de obtener en condiciones de laboratorio; sin embargo estos variantes no se han descrito en la Naturaleza. Una pregunta interesante que podemos hacernos es por qué no se han detectado en aislados clínicos estas variantes de CTX-M resistentes a BLiBL. Las razones pueden ser varias, como ya se ha discutido en el capítulo anterior. Aquí solo exploraremos en más detalle uno de estas razones, la dificultad de identificar el fenotipo de estas variantes en la clínica debido al fenómeno del antagonismo pleiotrópico.

En el trabajo presentado en el capítulo 1 de esta Tesis se pudo comprobar que todas las enzimas estudiadas de los 3 linajes evolutivos de las β -lactamasas de tipo CTX-M adquirieron mutaciones que les proporcionan resistencia o susceptibilidad disminuida frente a BLiBLs, pero que como consecuencia pierden actividad frente a las cefalosporinas (antagonismo pleiotrópico). Parecería que o bien el hecho de que aparezcan este tipo de mutantes *IR*-CTX-M es difícil, o que estamos en presencia de una detección insuficiente de los mismos en el laboratorio con los métodos comerciales para determinar la sensibilidad antibiótica. En cuanto a la primera posibilidad, no creemos que el fenómeno del antagonismo pleiotrópico dificulte la aparición de estos mutantes *IR*-CTX-M, pues tanto las β -lactamasas tipo TEM como SHV han desarrollado capacidad de conferir resistencia a oximinocefalosporinas (fenotipo BLEE) o a BLiBL (fenotipo IRT o *IR*-SHV) y en el caso de las β -lactamasas tipo TEM (más prevalentes que las β -lactamasas tipo SHV), se han detectado 12 variantes que confieren simultáneamente fenotipo BLEE+IRT. En el capítulo 1 de esta Tesis se describe la obtención de un doble mutante S130G+L169S en la β -lactamasa CTX-M-10 del linaje de CTX-M-1/CTX-M-3 capaz de restituir parcialmente el antagonismo pleiotrópico observado en el mutante simple CTX-M-10_{S130G}. Por lo tanto esta opción del antagonismo pleiotrópico es un factor importante pero no limitante en la selección y/o detección de variantes *IR*-CTX-M.

Otra opción podría sugerir un problema más relacionado con un tamaño poblacional

(proporción de bacterias portadoras de *bla*_{CTX-M}) aún bajo. Sin embargo se han descrito mutantes resistentes a inhibidores en las β -lactamasas tipo GES, poco prevalentes ⁽¹⁶⁷⁾, GES-RI y variantes BLEE-GES-RI, tales como GES-4, GES-6, GES-13 ⁽¹²¹⁾. Por lo tanto, la opción que se nos ocurre más probable es la dificultad de ser detectado con los métodos comerciales empleados en un laboratorio de Microbiología clínica. Responder a esta cuestión sobre el posible enmascaramiento de un fenotipo *IR*-CTX-M por los fenotipos IRT o IR-SHV será el objetivo de este capítulo 2.

1. Controles de calidad para mejorar la detección de mecanismos de resistencias complejos a los antimicrobianos.

En 1995 la Organización Mundial de la Salud (OMS) inició un programa de control focalizado en la susceptibilidad antibiótica para garantizar la calidad de los resultados emitidos en un área determinada ⁽²⁴⁹⁾. Inicialmente tan solo 17 laboratorios se inscribieron en este programa (WHONET), pero progresivamente el número de laboratorios fue aumentando (130 en 2001...). En los laboratorios de Microbiología se llevan a cabo programas de control de calidad internos para evaluar la precisión de la metodología, la calidad de los reactivos y medios y la capacitación técnica de quienes llevan a cabo estos estudios. Gracias a estos programas de control de calidad, los laboratorios de Microbiología han mejorado la precisión de los test de sensibilidad antimicrobiana ⁽⁵²⁾, ayudando a monitorizar la detección y diseminación de resistencia antibiótica en su comunidad. Adicionalmente, también son necesarios controles de calidad externos (ensayos de competencia/aptitud) para asegurar la calidad de la metodología para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos. En este caso, el procedimiento consiste en el envío de un conjunto de cepas con patrones de sensibilidad y mecanismos de resistencia definidos mediante métodos de referencia, desde un laboratorio de referencia a los laboratorios participantes. Esto sirve para comparar los resultados obtenidos por los diferentes laboratorios, tanto a nivel local como nacional ^(6,45,59,113,248,249). Desde 1998, la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) realiza este tipo de controles (www.seimc.org/control/index.asp) y en España, un importante número de laboratorios de Microbiología clínica forman parte del programa oficial de control de

calidad desarrollado por esta Sociedad. La aplicación de este programa a nivel nacional ha contribuido a mejorar la calidad de los resultados de sensibilidad y de la detección o inferencia de mecanismos de resistencia antibiótica de los laboratorios españoles.

Sin embargo, la epidemiología de los mecanismos de resistencia bacterianos es dinámica y va cambiando con el tiempo, por ello, estos controles deben realizarse periódicamente teniendo en cuenta aquellos mecanismos de resistencia prevalentes en ese momento. En este sentido numerosos estudios de control de calidad se han llevado a cabo a través de la SEIMC. Varios ejemplos de la necesidad de controlar el desempeño de los laboratorios de Microbiología consisten en la evaluación de su capacidad para detectar las BLEE, β -lactamasas plasmídicas AmpC (pAmpC) y carbapenemasas en la familia *Enterobacteriaceae* o *Pseudomonas aeruginosa* ^(45,59,113), asociadas o no a otros mecanismos de resistencia.

2. Métodos básicos para el estudio *in vitro* de la sensibilidad a los antimicrobianos en los laboratorios de Microbiología Clínica.

El estudio de la sensibilidad *in vitro* de los microorganismos a los antimicrobianos (*AST: antimicrobial susceptibility testing*) es una de las tareas más importantes en los laboratorios de Microbiología clínica. La finalidad principal de un estudio de sensibilidad es indicar al clínico aquellas alternativas terapéuticas más apropiadas para el tratamiento de los pacientes. No obstante, la correlación exacta entre los resultados *in vitro* y la respuesta clínica es muchas veces difícil de predecir, ya que existen numerosos factores que influyen en la interacción de los antimicrobianos y los microorganismos en el paciente (**Figura 7**). La metodología usada para realizar el estudio de sensibilidad tiene en consideración algunos de los siguientes factores para predecir más eficientemente la posible respuesta *in vivo* del microorganismo frente a un determinado antibiótico:

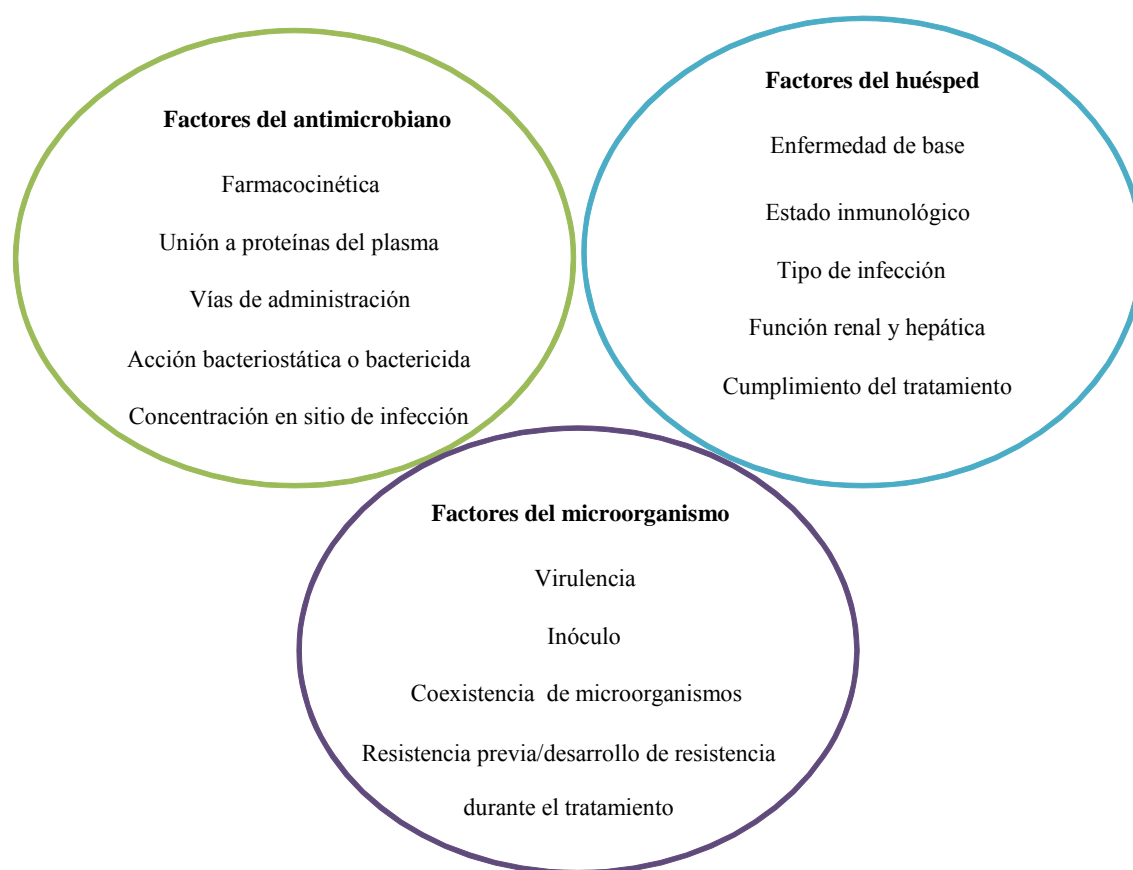


Figura 7. Factores que influyen en la correlación entre los resultados del antibiograma y la respuesta clínica.

A lo largo de los años, los laboratorios de Microbiología han ido implantando técnicas para la mejora en la interpretación de la sensibilidad a los antimicrobianos. La metodología utilizada en los laboratorios de Microbiología clínica para el estudio de la sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos se basa en métodos de difusión y/o métodos de dilución. Cada laboratorio de Microbiología establece según su estructura, demanda asistencial y Política de Antibióticos, un esquema de organización y técnicas de trabajo que aseguren la realización e información posterior de los antibiogramas. Comúnmente las técnicas de microdilución en caldo son empleadas en plataformas automatizables, por su alta carga de trabajo y los métodos de difusión se emplean manualmente para revelar la presencia de algún mecanismo de resistencia (BLEE, β -lactamasa inducible...) o para conocer sensibilidad a antibióticos no incluidos en los sistemas automatizados.

2.1. Equipos automatizados.

En la actualidad, en la mayoría de los casos, se utilizan métodos automatizados de microdilución en caldo (mediante el empleo de paneles prediseñados) que permiten asumir altas cargas de trabajo, pero que tienen el inconveniente de un coste elevado (uno de los procedimientos más caros en un laboratorio de Microbiología clínica). Estos equipos llevan instalados programas informáticos (sistemas expertos de interpretación) que contribuyen a la interpretación de los resultados del antibiograma ⁽²⁶⁴⁾. Entre estos equipos y, en orden decreciente en cuanto a su utilización en los laboratorios de Microbiología, encontramos los siguientes: MicroScan WalkAway (Dade MicroScan Inc., West Sacramento, CA, EE.UU), Vitek2 (BioMérieux, Inc, Durham NC, EEUU), Wider (sistema semiautomático, Fco Soria Melguizo, Madrid, España) y Phoenix (BD Biosciences, Sparks, MD, EEUU).

2.2. Técnicas manuales para la detección de β -lactamasas en microorganismos gram-negativos.

Si bien de manera rutinaria las pruebas de difusión en disco son aun empleadas en laboratorios pequeños de Microbiología, por su sencillez y bajo coste, o para bacterias de difícil crecimiento en los sistemas automáticos como *Streptococcus pneumoniae*, hoy en día, las principales aplicaciones de las técnicas de difusión en disco son: i) ampliar el número de antimicrobianos (que aquellos presentes en los sistemas automáticos) para el estudio de la sensibilidad en bacilos Gramnegativos con el fin de identificar nuevos fenotipos enzimáticos; ii) para confirmar mediante la técnica de doble difusión con discos la presencia de mecanismos de resistencia inferidos que serían difíciles de identificar por métodos automáticos ⁽¹³⁶⁾. Así la producción de una BLEE puede identificarse por la presencia de “halo de cerradura” al enfrentar a una distancia de 20-25 mm discos de CTX (30 μ g) y AMC (20/10 μ g) (**Figura 8A**) (también valdrían otros antibióticos como CAZ o aztreonam, AZT). Se produce una ampliación del halo de inhibición (sinergia) en las proximidades del disco de AMC, debido a que el ácido clavulánico inactiva a la β -lactamasa y hace que los antibióticos aumenten su actividad inhibitoria en la zona de intersección.

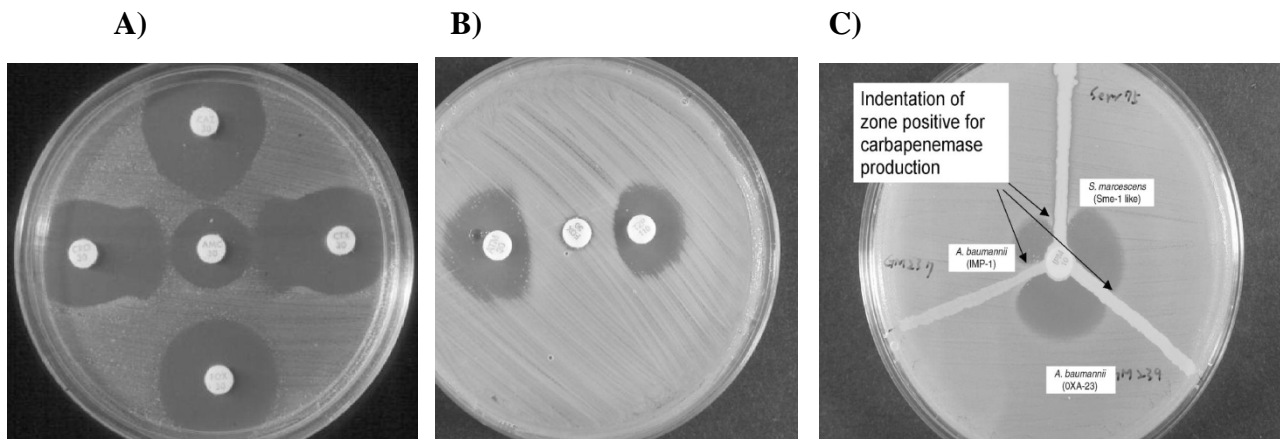


Figura 8. **A)** Test de doble difusión en disco donde se observa el halo en forma de cerradura cuando el disco de AMC (en posición central) se enfrenta a discos de cefotaxima (CTX), ceftriaxona (CRO) y ceftazidima (CAZ), pero que no se observa con discos de cefoxitina (FOX, disco de la parte superior de la placa). **B)** Test de doble difusión para detectar la inducción de β -lactamasas de tipo AmpC. **C)** Test de Hodge para la identificación de carbapenemasas.

Las β -lactamasas AmpC inducibles se asocian con un aumento en el riesgo de fracaso terapéutico, ya que la inducción confiere la capacidad de un organismo para llegar a ser más resistente durante la terapia con antibióticos β -lactámicos. Las cefamicinas (cefoxitina y cefotetan) son buenos agentes de cribado para detectar la inducción de β -lactamasas de tipo AmpC (**Figura 8B**). La prueba de aproximación de discos (descrita por Sanders en 1979) para la identificación de β -lactamasas cromosómicas inducibles (hiperproducción de AmpC), consiste en colocar un disco de FOX u otro antibiótico inductor (Imipenem, IMP) en las proximidades de un disco de cefamandol, CXM, o CTX (antibiótico testigo). El test será positivo si se observa un halo de inhibición truncado del antibiótico testigo en la zona adyacente del disco del antibiótico inductor. Otro uso reciente de los métodos de difusión es el test de Hodge, para la detección de carbapenemasas (aunque no diferencia entre metalo- β -lactamasas y serin- β -lactamasas) ⁽¹⁶¹⁾. El imipenem es el agente más sensible pero el menos específico, identifica serin- β -lactamasas tipo OXA (**Figura 8C**).

Un sistema alternativo a la prueba de doble difusión con discos de gran utilidad, es la prueba de gradiente de difusión con las tiras de Etest. Para la detección de BLEE existen tiras de Etest que presentan en uno de los extremo un gradiente de concentraciones de CAZ

de 0,5 a 32 $\mu\text{g/ml}$ y en el otro extremo un gradiente de CAZ de 0,125 a 8 $\mu\text{g/ml}$ y ácido clavulánico (CLAV) a una concentración fija de 4 $\mu\text{g/ml}$. La diferencia de los tamaños de las elipses de inhibición (valor de la CMI) en los dos extremos de la tira de Etest (**Figura 9**) indicará la presencia de una BLEE. Para las β -lactamasas de tipo CTX-M se pueden utilizar las tiras de CTX + CTX/CLAV (ya que estas enzimas, en general, no afectan sustancialmente a la CAZ).



Figura 9. Etest para la detección de BLEE de tipo CTX-M, en el extremo izquierdo se aprecia el halo de inhibición a CTX/CAZ+CLAV y el extremo derecho se observa crecimiento a lo largo de la tira de CTX/CAZ, debido a la presencia de una BLEE.

3. Interpretación del perfil de resistencias según los puntos de corte (*breakpoints*) establecidos por los diferentes comités.

El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*) anteriormente conocido como “El Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS)”, es una organización sin ánimo de lucro, compuesto por miembros que representan múltiples disciplinas y que lleva en funcionamiento más de 40 años. Su misión es promover el desarrollo y el uso voluntario de estándares y guías consensuados de laboratorio. Los documentos para los análisis e informes de rutina para susceptibilidad antimicrobiana son desarrollados por un subcomité que incluye expertos en enfermedades infecciosas, medicamentos y prácticas de laboratorio clínico. Aunque ha sido siempre referente mundial, a partir del año 1997 el ESCMID (*European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases*) creó el EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), que es el Comité Europeo para la determinación de la

sensibilidad bacteriana a los antibióticos y ha logrado reunir en uno solo a los siguientes comités nacionales: *the British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC, Reino Unido), *Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (CA-SFM; Francia), *Commissie Richtlijnen Gevoeligheidsbepalingen* (CRG; Holanda), *Deutsches Institut für Normung* (DIN; Alemania), *the Norwegian Working Group on Antibiotics* (NWGA; Noruega) y *Swedish Reference Group for Antibiotics* (SRGA; Suecia). El objetivo de EUCAST es establecer puntos de corte comunes para la vigilancia de la resistencia antibiótica, armonizar los puntos de corte clínicos para los antimicrobianos tanto existentes como nuevos, para fomentar sistemas de evaluación de la calidad y para trabajar con grupos de fuera de Europa (por ejemplo con el CLSI) y lograr un consenso internacional para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos.

Las normas del CLSI el homólogo al EUCAST, se siguen en la mayoría de los países de América.

Cada comité tiene establecidos unos puntos de corte para englobar en las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I o R) a los diferentes antimicrobianos estudiados en el antibiograma (ver definición de puntos de corte en el capítulo 1, apartado 3.1.- predicción basada en parámetros PK/PD).

La principal diferencia entre EUCAST y CLSI es la eliminación o reducción de la categoría clínica de "intermedio" en el AST. EUCAST ha eliminado en parte esta categoría para muchos antimicrobianos, porque la farmacocinética-farmacodinámica (PK/PD) y los datos clínicos no permiten una categoría de "intermedio". Así, los resultados del AST se simplifican en la mayor parte de los casos informando cepas sensibles o resistentes. Adicionalmente, EUCAST ha variado los puntos de corte (diámetros de los halos de inhibición y CMIs), de manera que aumenta el número de cepas resistentes informadas. La interpretación del estudio de sensibilidad ha sufrido cambios notables sobre todo para los bacilos Gramnegativos. Los puntos de corte en el caso de los diámetros de los halos de inhibición para *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, se han aumentado para cefalosporinas de amplio espectro, carbapenems y fluoroquinolonas en la versión de EUCAST 2011, comparándola con la versión de CLSI de 2009. Más recientemente, CLSI en sus versiones de 2010 y 2011 incrementa estos puntos de corte para

las cefalosporinas y los carbapenems, pero no para fluoroquinolonas. Las últimas actualizaciones para ambos comités han tenido lugar en este año 2013 y se han basado en datos clínicos, propiedades PK/PD y en las distribuciones de las CMIs.

La adopción de nuevas guías y puntos de corte tiene una gran repercusión en los resultados del *AST* que se informan desde los laboratorios de Microbiología clínica, lo que conlleva a cambios en las prescripciones antibióticas por los médicos ^(109,142).

Objetivo

El objetivo de este capítulo fue llevar a cabo un estudio multicéntrico a nivel nacional, bajo el apoyo del control de calidad de la SEIMC, para evaluar la capacidad de los laboratorios españoles de Microbiología clínica en la detección de fenotipos complejos de las β -lactamasas de tipo CTX-M con resistencia o sensibilidad disminuida a BLiBL.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas.

Se utilizaron dos cepas de *E. coli* [MKW505 y su variante isogénica MH621 defectiva en *OmpF*, ^(88,227)] para transformar diferentes construcciones del plásmido pBGS18 ⁽²³⁹⁾ portador de diferentes genes *bla*. En total se estudiaron 14 cepas que se integraron en diferentes grupos: i) *Cepas productoras de BLEE-CTX-M salvajes*: las construcciones plasmídicas pBGS18-*bla*_{CTX-M-1}, pBGS18-*bla*_{CTX-M-15} y pBGS18-*bla*_{CTX-M-14} se transformaron en las cepas de *E. coli* MKW505 (CCSRC01, CCSRC02, CCSRC05 respectivamente) y MH621 (CCSRC06, CCSRC09 y CCSRC10 respectivamente); ii) *Cepas productoras de variantes de CTX-M con diferente patrón de sensibilidad disminuida a BLiBLs* ⁽²¹⁴⁾: *E. coli* MH621 expresando las enzimas CTX-M (CTX-M-1_{S130G}, CTX-M-1_{S237G}, CTX-M-15_{S130G}, y CTX-M-14_{K234R}, correspondientes a las cepas CCSRC03, CCSRC04, CCSRC07 y CCSRC11 respectivamente), BLiBL. Este grupo puede diferenciarse en cepas con verdadero patrón *IR-CTX-M* (*Inhibitor Resistant-CTX-M*) de resistencia a BLiBL (CTX-M-1_{S130G} y CTX-M-15_{S130G},) o cepas con patrón de *CM-CTX-M*, *complex-mutant-CTX-M*, (CTX-M-14_{K234R} y CTX-M-1_{S237G}). Además en este grupo también se incluyó a la cepa de *E. coli* MH621 que expresa simultáneamente las β -lactamasas CTX-M-15 y OXA-1 (CCSRC08), es decir se trataría de una cepa con fenotipo BLEE y de resistencia a BLiBLs (fenotipo *Complex Mutant*); iii) *Cepas control*: la cepa CCSRC12 que corresponde a la cepa de referencia de *E. coli* ATCC 25922, recomendada para este tipo de estudios por CLSI, y las cepas CCSR13 y CCSRC14 que son dos cepas clínicas de *E. coli* portadoras de las β -lactamasas IRT-2 (*Inhibitor Resistant TEM*) ⁽¹⁴⁴⁾ y CMY-2 (AmpC plasmídica) ⁽¹⁵⁹⁾, respectivamente. Una parte importante de estas cepas fueron obtenidas durante el trabajo de investigación relacionado en la presente Tesis.

La determinación de la sensibilidad de estas 14 cepas a diferentes antibióticos β -lactámicos se llevó a cabo por duplicado en dos laboratorios de Microbiología: Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid, España) y Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, España), utilizando las técnicas manuales de microdilución en caldo, la difusión por disco ^(55,57) y mediante tiras de gradiente de difusión (Etest, BioMérieux, France). Los resultados de las CMIs se evaluaron independientemente en ambos laboratorios

y el valor de referencia asignado para el estudio correspondió al valor modal de ambos centros. Cuando no pudo determinarse el valor modal, se volvió a repetir la determinación de la CMI por duplicado en cada centro para estimar el valor más probable. Una vez asignado un valor, se categorizaron como sensibles, intermedios y resistentes (S, I, R) según los criterios del CLSI y EUCAST ^(56,252). Los antibióticos β -lactámicos estudiados fueron: AMP, AMC, TIC, PTZ, CEF, CFZ, CXM, FOX, CAZ, CTX, FEP, ATM, IPM, MEM y ETP.

Construcción en el laboratorio de las cepas seleccionadas.

Las construcciones de los plásmidos que codifican para las diferentes enzimas de tipo CTX-M (CTX-M-1, CTX-M-14 y CTX-M-15) así como variantes que poseen alguna mutación (CTX-M-1_{S130G}, CTX-M-1_{S237G}, CTX-M-15_{S130G}, y CTX-M-14_{K234R}) se habían obtenido como se describe en el capítulo 1⁽²¹⁴⁾, en el que se introdujeron mediante transformación con cloruro de calcio ⁽⁷¹⁾ en las cepas isogénicas de *E.coli* MKW505 y MH621 ⁽⁸⁸⁾ para cuantificar el impacto de la pérdida de porinas en la interpretación de mecanismos de resistencia. Por ejemplo, cuando se combinan una alteración de porinas y la presencia de AmpC plasmídica, se puede conferir resistencia a cefoxitina y confundirse con fenotipos de carbapenemasas como KPC ^(150,151).

Adicionalmente, se realizó una construcción nueva en el plásmido pBGS18⁻. Los genes *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{OXA-1} que codifican simultáneamente para CTX-M-15 y OXA-1 se clonaron conjuntamente en el plásmido pBGS18⁻ y se transformaron en la cepa MH621 (por tanto la cepa del control de calidad CCSRC08 presentaba hasta tres mecanismos simultáneos de resistencia). Se llevaron a cabo PCRs para amplificar los genes *bla* completos sin incluir sus regiones promotoras., pero si sus secuencias Shine-Dalgarno. Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

CTX-M-15	<i>EcoR</i> IFw:	5'-
GGAATTCGTTGTTATTTTCGTATCTTCCA-3';	CTX-M-15	<i>BamH</i> IRv: 5'-
CGGGATCCGTTTCCGCTATTACAA-3';	OXA-1	<i>BamH</i> IFw: 5'-
CGGGATCCCTCATGTCAAACGTTG-3'	y OXA-1	<i>XbaI</i> Rv: 5'-
GCTCTAGATTGAAGGGTTGGGCGATT-3'.		

Primero se clonó el gen *bla*_{OXA-1} en el vector pBGS18⁻, previa digestión de ambos con las enzimas de restricción *BamHI* y *XbaI* y se transformó en la cepa *E. coli* MH621. Posteriormente, el gen *bla*_{CTX-M-15} se amplificó y se

clonó en el vector pBGS18-*bla*_{OXA-1}, previa digestión de ambos (producto de PCR y vector) con las enzimas *EcoRI* and *BamHI* e igualmente fue introducido en la cepa de laboratorio libre de plásmido MH621. Finalmente, se comprobó la presencia de ambas β -lactamasas, mediante una PCR con los cebadores CT-X-M-15 *EcoRI*Fw y OXA-1 *XbaI*Rv y se secuenció el producto de PCR (2 Kb). Las cepas control correspondieron a aislados clínicos bien caracterizados obtenidos en el hospital Ramón y Cajal, a excepción de la cepa ATCC 25922 que es la cepa sensible de laboratorio empleada habitualmente para estos estudios.

Diseño del estudio.

El estudio se diseñó a nivel nacional, en el marco del programa de Control de Calidad Externo de la SEIMC. A través de los canales de comunicación del Grupo de Control de Calidad, se envió una carta invitando a todos los laboratorios inscritos en dicho programa a participar en este nuevo control de calidad, titulado “Estudio multicéntrico para determinar la capacidad de los laboratorios españoles para identificar fenotipos de resistencia a β -lactámicos en *Escherichia coli*”. A esta propuesta aceptaron participar un total de 68 laboratorios.

Antes del envío masivo a todos los centros participantes, desde la sede central del Control de Calidad, en Valencia, se re-envió una copia de las 14 cepas a los hospitales promotores del estudio que hacían de centros de referencia para comprobar nuevamente por secuenciación los genes *bla* presentes en cada una de las 13 cepas . Una vez todo comprobado, las 14 cepas fueron enviadas como "aislados de hemocultivos" a los 68 laboratorios participantes en Octubre de 2012, en torundas con medio de transporte convencional. Las torundas se etiquetaron como *E. coli* seguido de un código que fue desde CCSRC01 al CCSRC14. A los laboratorios participantes se les enviaron también instrucciones para realizar el estudio de sensibilidad ya que las cepas portadoras del plásmido pBGS18 debían ser siempre crecidas en presencia de kanamicina para evitar su pérdida (se enviaron discos de kanamicina), y a continuación se debían seguir los métodos de rutina establecidos en cada uno de los laboratorios.

Se solicitó que la emisión de los resultados se realizara de manera electrónica mediante el envío de un formulario para cada cepa, en el que se incluía: i) el método de rutina

utilizado (sistemas automáticos/semiautomáticos o métodos manuales), ii) los resultados cualitativos y/o cuantitativos (diámetro de las zonas de inhibición o los valores de MICs), iii) el criterio utilizado para los puntos de corte (CLSI, EUCAST u otros), iv) la interpretación de la categoría clínica informada a los clínicos (sensible, intermedio o resistente), v) si se habían realizado tests adicionales para confirmar algún valor de CMI o fenotipo encontrado y cualquier observación sobre los fenotipos de resistencia y vi) si lo consideraran oportuno, el tratamiento seleccionado, en función de la política de cada laboratorio.

Evaluación de los resultados emitidos.

Una vez terminado el plazo concedido a los laboratorios participantes se procedió a analizar los valores de CMIs emitidos para todas las cepas y antibióticos probados, comparando los valores de cada centro con los valores validados de referencia obtenidos en los laboratorios de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid y Hospital Marqués de Valdecilla de Santander. Las discrepancias se clasificaron, utilizando criterios reconocidos, como *very major error* (VME), *major error* (ME) y *minor error* (mE) ⁽⁵⁴⁾. Encontramos VME cuando una cepa es identificada como sensible para un determinado antibiótico por los laboratorios participantes, mientras que según los centros de referencia deberían ser consideradas como resistentes; contrariamente, se consideran ME cuando la categoría clínica para un antibiótico emitida por los laboratorios participantes es de resistente y según los valores de referencia de los centros promotores debían ser identificados como sensibles y finalmente, los mE se atribuyeron cuando los resultados obtenidos por los participantes se categorizaron como sensibles o resistentes y tenían que ser intermedios según los resultados de los centros de referencia, y viceversa. También se tuvo en cuenta la modificación de las categorías clínicas por algunos laboratorios cuando sospecharon la presencia de un mecanismo de resistencia determinado. Los errores en las categorías de interpretación se analizaron para cada laboratorio, en función de los puntos de corte utilizados, CLSI o EUCAST.

Resultados

Tasas de participación, metodología aplicada para el análisis de la susceptibilidad antimicrobiana y los puntos de corte utilizados.

Si bien aceptaron participar 68 laboratorios de Microbiología clínica, finalmente se recibieron resultados 64 laboratorios (94.1%). El 93.7% de los centros (60/64) dieron resultados para todas las cepas, el 4.7% (3/64) para 13 cepas y hubo 1 centro que únicamente respondió los resultados de 1 cepa (1.6%). De los 62 centros que utilizaron sistemas automáticos, 40 (64.5%) utilizaron un equipo, 10 centros 2 o más equipos (16.1%) y 12 (19.3%) utilizaron sistemas automáticos en combinación con métodos manuales. En total se utilizaron equipos automatizados en 77 ocasiones: MicroScanWalkAway (37/77, 48.0%), Vitek2 (20/77, 26.0%), Wider (14/77, 18.1%) y Phoenix (6/77, 7.8%). Algunos centros realizaron tests complementarios para confirmar fenotipos de resistencia (ej: producción de BLEE) o para confirmar algún valor de CMI: 51.6% (33/64) utilizaron métodos de difusión con disco y un 18.8% (12/64) utilizó test en gradiente (en todos los casos, tiras de Etest).

La mayoría de los laboratorios (43/64, 67.2%) utilizaron los criterios de CLSI, un 25.0% (16/64) de los centros aplicaron los criterios de EUCAST, el 6.2% (4/64) combinaron ambos criterios y por último un centro (1.6%) además incluyó correcciones según el grupo MENSURA (Mesa Española para la Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos) ⁽¹⁵⁷⁾.

Resultados del análisis de la sensibilidad.

Los valores de referencia de las CMIs obtenidos por los dos centros promotores del estudio, mediante microdilución en caldo, así como las categorías clínicas asignadas según los puntos de corte de CLSI y EUCAST, se muestran en la **tabla 7**. El total de discrepancias fue de un 11.5% [1,233 discrepancias de un total de 10,689 tests realizados para todos los antimicrobianos/cepas/centros, y van desde un 3.0% a un 9.8% para los VMEs y ME, respectivamente (**tabla 9**)]. Los VME (“falsa sensibilidad”) estuvieron por debajo del 8% (teniendo en cuenta la suma de las discrepancias de los centros que utilizaron CLSI y EUCAST) para todos los β -lactámicos, presentando porcentajes más

elevados: TZP (7.1%), CXM (7.1%), AMC (6.5%). Para los ME (“falsa resistencia”) los antibióticos más afectados fueron: FEP (29.1%), CAZ (28.5%), TZP (25.4%).

La **tabla 10** muestra los tipos de errores dependiendo de los sistemas utilizados (automático/semiautomático/manual) o de los cambios que realizan los microbiólogos cuando infieren un mecanismo de resistencia determinado. En general, la metodología es la responsable de un 61.9% (724/1169) del total de los errores, mientras que las modificaciones manuales derivadas de la interpretación por el microbiólogo llegan a un 38.1% (445/1169). Estos últimos errores involucraron a un 80% de los participantes y se observó básicamente para los ME (73.5%). En cuanto a las discrepancias debidas a los puntos de corte, los antibióticos más afectados fueron la PTZ y el FEP para los mEs. Entre los ME, las cepas más afectadas por las combinaciones de BLiBLs fueron las productoras de CTX-M-15, CTX-M-14 y CTX-M-14_{K234R} en el contexto OmpF⁻ (CCSR06, -10, -11, respectivamente) y las más afectadas por las cefalosporinas, y además de éstas, la cepa productora de CTX-M-1 las afectadas por las cefalosporinas (ver **tabla 8**). En el caso de los VME, las cepas portadoras de CTX-M-15 y CTX-M-15+OXA-1 en el contexto OmpF⁻ (CCSR06 y CCSR08, respectivamente).

La **tabla 11** muestra las discrepancias por cepas. Los centros que utilizaron CLSI mostraron tasas de error discretamente mayores (11.8%) que los centros que utilizaron EUCAST (10.6%), mayoritariamente debido a los mEs (6.5% y 3.3%, respectivamente). Sin embargo, los VMEs fueron proporcionalmente más frecuentes en los centros que utilizaron EUCAST (0.7% *versus* 3.0% en los centros que utilizaron CLSI y EUCAST, respectivamente).

Tabla 7. Resultados del estudio de sensibilidad a antimicrobianos e interpretación de las categorías clínicas según los puntos de corte de CLSI⁽⁵⁶⁾ y de EUCAST (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/).

Código	Porina/ β -lactamasa	Fenotipo	AMP	AMC	TIC	PTZ	CEF ^a	CFZ ^a	CXM
CCSRC01	OmpF ⁺ /CTX-M-1	BLEE-CTX-M	>256 (R/R)	16 (I/R)	>256 (R/R)	2 (S/S)	>256 (R/-)	>256 (R/-)	>128 (R/R)
CCSRC02	OmpF ⁻ /CTX-M-1	BLEE-CTX-M	>256 (R/R)	32 (R/R)	>256 (R/R)	2 (S/S)	>256 (R/-)	>256 (R/-)	>128 (R/R)
CCSRC03	OmpF/CTX-M-1 _{S130G}	IR-CTX-M	>256 (R/R)	128 (R/R)	>256 (R/R)	128 (R/R)	128 (R/-)	32 (R/-)	16 (I/R)
CCSRC04	OmpF ⁻ /CTX-M-1 _{S237G}	CM-CTX-M	>256 (R/R)	128 (R/R)	>256 (R/R)	2 (S/S)	>256 (R/-)	>256 (R/-)	>128 (R/R)
CCSRC05	OmpF ⁺ /CTX-M-15	BLEE-CTX-M	>256 (R/R)	8 (S/S)	>256 (R/R)	2 (S/S)	>256 (R/-)	>256 (R/-)	>128 (R/R)
CCSRC06	OmpF/CTX-M-15	BLEE-CTX-M	>256 (R/R)	16 (I/R)	>256 (R/R)	4 (S/S)	>256 (R/-)	>256 (R/-)	>128 (R/R)
CCSRC07	OmpF ⁻ /CTX-M-15 _{S130G}	IR-CTX-M	>256 (R/R)	128 (R/R)	>256 (R/R)	64 (I/R)	64 (R/-)	32 (R/-)	16 (I/R)
CCSRC08	OmpF/CTX-M-15 + OXA-1	CM-CTX-M	>256 (R/R)	128 (R/R)	>256 (R/R)	64 (I/R)	>256 (R/-)	256 (R/-)	>128 (R/R)
CCSRC09	OmpF ⁺ /CTX-M-14	BLEE-CTX-M	>256 (R/R)	32 (R/R)	>256 (R/R)	2 (S/S)	>256 (R/-)	>256 (R/-)	>128 (R/R)
CCSRC10	OmpF/CTX-M-14	BLEE-CTX-M	>256 (R/R)	32 (R/R)	>256 (R/R)	4 (S/S)	>256 (R/-)	>256 (R/-)	>128 (R/R)
CCSRC11	OmpF ⁻ /CTX-M-14 _{K234R}	CM-CTX-M	>256 (R/R)	64 (R/R)	>256 (R/R)	2 (S/S)	>256 (R/-)	>256 (R/-)	64 (R/R)
CCSRC12	ATCC 25922	Salvaje	4 (S/S)	4 (S/S)	4 (S/S)	2 (S/S)	8 (S/-)	2 (S/-)	4 (S/S)
CCSRC13	IRT-2	IRT	>256 (R/R)	32 (R/R)	>256 (R/R)	8 (S/S)	16 (I/-)	2 (S/-)	16 (I/R)
CCSRC14	CMY-2	AmpC Plasmidica	>256 (R/R)	64 (R/R)	>256 (R/R)	8 (S/S)	>256 (R/-)	>256 (R/-)	128 (R/R)

Tabla 7. Continuación.

Código	FOX ^a	CTX	CAZ	ATM	FEP	IPM	MEM	ETP
CCSRC01	4 (S/-)	>256 (R/R)	4(S/I)	64 (R/R)	16 (I/R)	0.5 (S/S)	0.06 (S/S)	0.06 (S/S)
CCSRC02	8 (S/-)	>256 (R/R)	16 (R/R)	256 (R/R)	128 (R/R)	0.5 (S/S)	0.12 (S/S)	0.06 (S/S)
CCSRC03	8 (S/-)	0.125 (S/S)	1 (S/S)	0.5 (S/S)	0.25 (S/S)	0.5 (S/S)	≤0.03 (S/S)	≤0.03 (S/S)
CCSRC04	8 (S/-)	>256 (R/R)	16 (R/R)	256 (R/R)	32 (R/R)	0.5 (S/S)	≤0.03 (S/S)	0.125 (S/S)
CCSRC05	4 (S/-)	128 (R/R)	4 (S/I)	16 (R/R)	4 (S/S)	0.5 (S/S)	≤0.03 (S/S)	≤0.03 (S/S)
CCSRC06	8 (S/-)	256 (R/R)	16 (R/R)	32 (R/R)	32 (R/R)	0.5 (S/S)	0.06 (S/S)	0.125 (S/S)
CCSRC07	8 (S/-)	0.125 (S/S)	1 (S/S)	1 (S/S)	0.25 (S/S)	0.5 (S/S)	0.06 (S/S)	≤0.03 (S/S)
CCSRC08	8 (S/-)	128 (R/R)	32 (R/R)	64 (R/R)	32 (R/R)	0.5 (S/S)	≤0.03 (S/S)	0.125 (S/S)
CCSRC09	4 (S/-)	>256 (R/R)	4 (S/I)	16 (R/R)	32 (R/R)	0.5 (S/S)	≤0.03 (S/S)	≤0.03 (S/S)
CCSRC10	8 (S/-)	>256 (R/R)	16 (R/R)	128 (R/R)	256 (R/R)	0.5 (S/S)	≤0.03 (S/S)	0.5 (S/S)
CCSRC11	8 (S/-)	1 (S/S)	2 (S/I)	8 (R/R)	8 (S/R)	0.5 (S/S)	≤0.03 (S/S)	0.5 (S/S)
CCSRC12	4 (S/-)	0.06 (S/S)	0.25 (S/S)	0.25 (S/S)	≤0.01 (S/S)	0.25 (S/S)	≤0.03 (S/S)	≤0.03 (S/S)
CCSRC13	4 (S/-)	0.25 (S/S)	0.25 (S/S)	≤0.01 (S/S)	1 (S/S)	0.12 (S/S)	≤0.03 (S/S)	≤0.03 (S/S)
CCSRC14	> 128 (R/-)	16 (R/R)	32 (R/R)	8 (I/R)	1 (S/S)	0.25 (S/S)	0.06 (S/S)	0.5 (S/S)

Entre paréntesis la categoría clínica según los criterios de CLSI/EUCAST. ^aAusencia de criterio según EUCAST.

Tabla 8. Comparación de resultados de los centros participantes y los centros de referencia. Cálculo de los errores en las categorías clínicas [*minor* (mE), *major* (ME) y *very major* (VME) errors] para cada combinación de antimicrobiano/cepa, según los criterios de CLSI y EUCAST.

Código	Porina/ β -lactamasa	Amoxicilina-clavulánico						Piperacilina-tazobactam					
		Ref ^a		No, ^b			Errores (%) ^c	Ref ^a		No, ^b			Errores (%) ^c
				mE	ME	VME				mE	ME	VME	
CCSRC01	OmpF ⁺ /CTX-M-1	16 (I/R)	CLSI	45	22 (48,9)	NA	NA ^e	2 (S/S)	CLSI	44	2 (4,5)	6 (13,6)	NA
			EUCAST	19	1 (5,3)	NA	3 (15,8)			18	1 (5,6)	6 (33,3)	NA
CCSRC02	OmpF ⁺ /CTX-M-1	32 (R/R)	CLSI	43	30 (69,8)	NA	0 (0,0)	2 (S/S)	CLSI	42	1 (2,4)	5 (11,9)	NA
			EUCAST	19	0 (0,0)	NA	0 (0,0)			18	0 (0,0)	7 (38,9)	NA
CCSRC03	OmpF ⁺ /CTX-M-1 _{S130G}	128 (R/R)	CLSI	43	0 (0,0)	NA	0 (0,0)	128 (R/R)	CLSI	41	3 (7,3)	NA	0 (0,0)
			EUCAST	19	1 (5,3)	NA	0 (0,0)			18	0 (0,0)	NA	0 (0,0)
CCSRC04	OmpF ⁺ /CTX-M-1 _{S237G}	128 (R/R)	CLSI	44	9 (20,5)	NA	0 (0,0)	2 (S/S)	CLSI	42	2 (4,8)	6 (14,3)	NA
			EUCAST	19	0 (0,0)	NA	0 (0,0)			18	0 (0,0)	7 (38,9)	NA
CCSRC05	OmpF ⁺ /CTX-M-15	8 (S/S)	CLSI	43	3 (7,0)	6(13,9)	NA	2 (S/S)	CLSI	41	1 (2,4)	4 (9,8)	NA
			EUCAST	19	0 (0,0)	6(31,6)	NA			18	0 (0,0)	5 (27,8)	NA
CCSRC06	OmpF ⁺ /CTX-M-15	16 (I/R)	CLSI	40	36 (90,0)	NA	NA	4 (S/S)	CLSI	39	2 (5,1)	4 (10,3)	NA
			EUCAST	19	1 (5,3)	NA	12 (63,2)			18	0 (0,0)	5 (27,8)	0
CCSRC07	OmpF ⁺ /CTX-M-15 _{S130G}	128 (R/R)	CLSI	43	2 (4,7)	NA	1 (2,3)	64 (I/R)	CLSI	40	26 (65,0)	NA	NA
			EUCAST	18	0 (0,0)	NA	1 (5,6)			17	0 (0,0)	NA	1 (5,9)
CCSRC08	OmpF ⁺ /CTX-M-15 + OXA-1	128 (R/R)	CLSI	44	7 (15,9)	NA	2 (4,5)	64 (I/R)	CLSI	42	34 (81,0)	NA	NA
			EUCAST	19	1 (5,3)	NA	0 (0,0)			18	0 (0,0)	NA	5 (27,8)
CCSRC09	OmpF ⁺ /CTX-M-14	32 (R/R)	CLSI	44	25 (56,8)	NA	3 (6,8)	2 (S/S)	CLSI	42	0 (0,0)	7 (16,7)	NA
			EUCAST	18	1 (5,6)	NA	2 (11,1)			17	0 (0,0)	6 (35,3)	NA
CCSRC10	OmpF ⁺ /CTX-M-14	32 (R/R)	CLSI	40	16 (40,0)	NA	6 (15)	4 (S/S)	CLSI	39	5 (12,8)	6 (15,4)	NA
			EUCAST	16	0 (0,0)	NA	1 (6,3)			14	0 (0,0)	7 (50,0)	NA
CCSRC11	OmpF ⁺ /CTX-M-14 _{K234R}	64 (R/R)	CLSI	42	2 (4,8)	NA	2 (4,8)	2 (S/S)	CLSI	40	7 (17,5)	14 (35)	NA
			EUCAST	19	0 (0,0)	NA	2 (10,5)			18	1 (5,6)	9 (50)	NA
CCSRC12	ATCC 25922	4 (S/S)	CLSI	44	0 (0,0)	0 (0,0)	NA	2 (S/S)	CLSI	42	0 (0,0)	1(2,4)	NA
			EUCAST	19	0 (0,0)	0 (0,0)	NA			18	0 (0,0)	0 (0,0)	NA
CCSRC13	IRT-2	32 (R/R)	CLSI	44	2 (4,5)	NA	1 (2,3)	8 (S/S)	CLSI	41	1 (2,4)	6 (14,6)	NA
			EUCAST	19	0 (0,0)	NA	0 (0,0)			18	1 (5,6)	3 (16,7)	NA
CCSRC14	CMY-2	64 (R/R)	CLSI	44	0 (0,0)	NA	0 (0,0)	8 (S/S)	CLSI	41	4 (9,8)	6 (14,6)	NA
			EUCAST	19	0 (0,0)	NA	0 (0,0)			18	1 (5,6)	5 (27,8)	NA

Tabla 8. Continuación.

Cefuroxima								Cefoxitina ^d								Cefotaxima							
Código	Ref ^a		No ^b		Errores (%) ^c			Ref ^a	No ^b		Errores (%) ^c			Ref ^a	No ^b		Errores (%) ^c						
					mE	ME	VME				mE	ME	VME				mE	ME	VME				
01	>128 (R/R)	CLSI	44	0 (0,0)	NA	0 (0,0)	4 (S/-)	CLSI	62	1(1,61)	9 (14,5)	NA	>256 (R/R)	CLSI	44	0 (0,0)	NA	0 (0,0)					
		EUCAST	19	0 (0,0)	NA	0 (0,0)							EUCAST	19	0 (0,0)	NA	0 (0,0)						
02	>128 (R/R)	CLSI	41	0 (0,0)	NA	0 (0,0)	8 (S/-)	CLSI	60	0 (0,0)	8 (13,3)	NA	>256 (R/R)	CLSI	43	0 (0,0)	NA	0 (0,0)					
		EUCAST	19	0 (0,0)	NA	0 (0,0)							EUCAST	19	0 (0,0)	NA	0 (0,0)						
03	16 (I/R)	CLSI	42	33 (78,6)	NA	NA	8 (S/-)	CLSI	60	1 (1,7)	4 (6,7)	NA	0,125 (S/S)	CLSI	43	0 (0,0)	6 (13,9)	NA					
		EUCAST	19	1 (5,3)	NA	13 (68,4)							EUCAST	18	0 (0,0)	2 (11,1)	NA						
04	>128 (R/R)	CLSI	42	0 (0,0)	NA	0 (0,0)	8 (S/-)	CLSI	61	0 (0,0)	10 (16,4)	NA	>256 (R/R)	CLSI	44	0 (0,0)	NA	0 (0,0)					
		EUCAST	19	0 (0,0)	NA	0 (0,0)							EUCAST	19	0 (0,0)	NA	0 (0,0)						
05	>128 (R/R)	CLSI	41	0 (0,0)	NA	0 (0,0)	4 (S/-)	CLSI	60	0 (0,0)	9 (15,0)	NA	128 (R/R)	CLSI	43	0 (0,0)	NA	1 (2,3)					
		EUCAST	19	0 (0,0)	NA	0 (0,0)							EUCAST	19	0 (0,0)	NA	0 (0,0)						
06	>128 (R/R)	CLSI	39	0 (0,0)	NA	0 (0,0)	8 (S/-)	CLSI	57	1 (1,8)	8 (14,0)	NA	256 (R/R)	CLSI	40	0 (0,0)	NA	0 (0,0)					
		EUCAST	19	0 (0,0)	NA	0 (0,0)							EUCAST	19	0 (0,0)	NA	0 (0,0)						
07	16 (I/R)	CLSI	41	32 (78,0)	NA	NA	8 (S/-)	CLSI	59	2 (3,4)	1 (1,7)	NA	0,125 (S/S)	CLSI	43	0 (0,0)	3 (7)	NA					
		EUCAST	18	1 (5,6)	NA	12 (66,7)							EUCAST	18	0 (0,0)	2 (11,1)	NA						
08	>128 (R/R)	CLSI	42	0 (0,0)	NA	0 (0,0)	8 (S/-)	CLSI	61	0 (0,0)	11 (18,0)	NA	128 (R/R)	CLSI	43	0 (0,0)	NA	1 (2,3)					
		EUCAST	19	0 (0,0)	NA	0 (0,0)							EUCAST	19	0 (0,0)	NA	0 (0,0)						
09	>128 (R/R)	CLSI	42	0 (0,0)	NA	1 (2,4)	4 (S/-)	CLSI	60	0 (0,0)	10 (16,7)	NA	>256 (R/R)	CLSI	43	0 (0,0)	NA	0 (0,0)					
		EUCAST	18	1 (5,6)	NA	0 (0,0)							EUCAST	18	0 (0,0)	NA	0 (0,0)						
10	>128 (R/R)	CLSI	38	0 (0,0)	NA	0 (0,0)	8 (S/-)	CLSI	54	1 (1,9)	7 (13,0)	NA	>256 (R/R)	CLSI	39	0 (0,0)	NA	0 (0,0)					
		EUCAST	16	0 (0,0)	NA	0 (0,0)							EUCAST	16	0 (0,0)	NA	0 (0,0)						
11	64 (R/R)	CLSI	40	1 (2,5)	NA	1 (2,5)	8 (S/-)	CLSI	59	0 (0,0)	10 (17,0)	NA	1 (S/S)	CLSI	41	5 (12,2)	25 (61)	NA					
		EUCAST	19	0 (0,0)	NA	1 (5,3)							EUCAST	19	3 (15,8)	11 (57,9)	NA						
12	4 (S/S)	CLSI	42	0 (0,0)	0 (0,0)	NA	4 (S/-)	CLSI	61	0 (0,0)	0 (0,0)	NA	0,06 (S/S)	CLSI	43	0 (0,0)	0 (0,0)	NA					
		EUCAST	19	0 (0,0)	0 (0,0)	NA							EUCAST	18	0 (0,0)	0 (0,0)	NA						
13	16 (I/R)	CLSI	42	32 (76,2)	NA	NA	4 (S/-)	CLSI	61	2 (3,3)	2 (3,3)	NA	0,25 (S/S)	CLSI	43	0 (0,0)	1 (2,3)	NA					
		EUCAST	19	0 (0,0)	NA	15 (78,9)							EUCAST	19	0 (0,0)	0 (0,0)	NA						
14	128 (R/R)	CLSI	42	1 (2,4)	NA	0 (0,0)	> 128(R/-)	CLSI	61	0 (0,0)	NA	0 (0,0)	16 (R/R)	CLSI	43	1 (2,3)	NA	2 (4,7)					
		EUCAST	19	0 (0,0)	NA	0 (0,0)							EUCAST	19	0 (0,0)	NA	1 (5,3)						

Tabla 8. Continuación.

Código	Ref ^a	Ceftazidima						Aztreonam						Cefepime					
			No ^b	Errores (%) ^c			Ref ^a		No ^b	Errores (%) ^c			Ref ^a		No ^b	Errores (%) ^c			
				mE	ME	VME				mE	ME	VME				mE	ME	VME	
01	4 (S/I)	CLSI	44	3 (6,8)	33 (75)	NA	64 (R/R)	CLSI	36	0 (0,0)	NA	0 (0,0)	16 (I/R)	CLSI	44	43 (97,7)	NA	NA	
		EUCAST	19	14 (73,7)	NA	NA		EUCAST	14	0 (0,0)	NA	0 (0,0)		EUCAST	19	0 (0,0)	NA	0 (0,0)	
02	16 (R/R)	CLSI	43	2 (4,7)	NA	0 (0,0)	256 (R/R)	CLSI	35	0 (0,0)	NA	0 (0,0)	128 (R/R)	CLSI	43	0 (0,0)	NA	0 (0,0)	
		EUCAST	18	0 (0,0)	NA	0 (0,0)		EUCAST	14	0 (0,0)	NA	0 (0,0)		EUCAST	19	0 (0,0)	NA	1(5,3)	
03	1 (S/S)	CLSI	43	0 (0,0)	4 (9,3)	NA	0,5 (S/S)	CLSI	36	0 (0,0)	4 (11,5)	NA	0,25 (S/S)	CLSI	43	0 (0,0)	3(7)	NA	
		EUCAST	19	0 (0,0)	1 (5,3)	NA		EUCAST	14	1 (7,1)	1 (7,1)	NA		EUCAST	19	1(5,3)	2(10,5)	NA	
04	16 (R/R)	CLSI	42	0 (0,0)	NA	0 (0,0)	256 (R/R)	CLSI	35	0 (0,0)	NA	0 (0,0)	32 (R/R)	CLSI	44	2(4,5)	NA	1(2,3)	
		EUCAST	19	0 (0,0)	NA	0 (0,0)		EUCAST	14	0 (0,0)	NA	0 (0,0)		EUCAST	19	0 (0,0)	NA	1(5,3)	
05	4 (S/I)	CLSI	41	0 (0,0)	NA	0 (0,0)	16 (R/R)	CLSI	35	0 (0,0)	NA	1 (2,9)	4 (S/S)	CLSI	43	4(9,3)	33(76,7)	NA	
		EUCAST	19	15 (78,9)	NA	NA		EUCAST	14	1 (7,1)	NA	0 (0,0)		EUCAST	19	2(10,5)	15(78,9)	NA	
06	16 (R/R)	CLSI	40	1 (2,5)	NA	0 (0,0)	32 (R/R)	CLSI	34	0 (0,0)	NA	0 (0,0)	32 (R/R)	CLSI	40	1(2,5)	NA	3(7,5)	
		EUCAST	19	0 (0,0)	NA	0 (0,0)		EUCAST	14	0 (0,0)	NA	0 (0,0)		EUCAST	19	0 (0,0)	NA	0 (0,0)	
07	1 (S/S)	CLSI	43	1 (2,3)	2 (4,7)	NA	1 (S/S)	CLSI	34	1 (3,0)	2 (5,9)	NA	0,25 (S/S)	CLSI	43	0 (0,0)	2(4,7)	NA	
		EUCAST	18	0 (0,0)	2 (11,1)	NA		EUCAST	13	0 (0,0)	0 (0,0)	NA		EUCAST	18	0 (0,0)	2(11,1)	NA	
08	16 (R/R)	CLSI	44	3 (7,5)	NA	1 (2,3)	64 (R/R)	CLSI	35	1 (2,9)	NA	0 (0,0)	32 (R/R)	CLSI	44	2(4,5)	NA	3(6,8)	
		EUCAST	19	0 (0,0)	NA	0 (0,0)		EUCAST	14	0 (0,0)	NA	1 (7,1)		EUCAST	19	0 (0,0)	NA	0 (0,0)	
09	4 (S/I)	CLSI	44	4 (9,1)	31 (70,5)	NA	16 (R/R)	CLSI	35	0 (0,0)	NA	1 (2,9)	32 (R/R)	CLSI	43	2(4,7)	NA	3(7)	
		EUCAST	18	12 (66,7)	NA	NA		EUCAST	13	0 (0,0)	NA	0 (0,0)		EUCAST	18	2(11,1)	NA	0 (0,0)	
10	16 (R/R)	CLSI	40	3 (7,5)	NA	3 (7,5)	128 (R/R)	CLSI	32	1 (3,1)	NA	1 (3,1)	256 (R/R)	CLSI	40	2(5)	NA	2(5)	
		EUCAST	16	1 (6,7)	NA	0 (0,0)		EUCAST	11	0 (0,0)	NA	0 (0,0)		EUCAST	16	0 (0,0)	NA	0 (0,0)	
11	2 (S/I)	CLSI	42	1 (2,4)	22 (52,4)	NA	8 (R/R)	CLSI	33	3(9,1)	NA	4 (12,1)	8 (S/R)	CLSI	41	2(4,9)	28 (68,3)	NA	
		EUCAST	19	12 (63,2)	NA	NA		EUCAST	14	2(14,3)	NA	2 (14,3)		EUCAST	19	0 (0,0)	NA	4(21,0)	
12	0,25 (S/S)	CLSI	44	0 (0,0)	0 (0,0)	NA	0,25 (S/S)	CLSI	35	0 (0,0)	0 (0,0)	NA	0,01 (S/S)	CLSI	44	0 (0,0)	0 (0,0)	NA	
		EUCAST	19	0 (0,0)	0 (0,0)	NA		EUCAST	14	1(7,1)	0 (0,0)	NA		EUCAST	19	0 (0,0)	0 (0,0)	NA	
13	0,25 (S/S)	CLSI	44	0 (0,0)	1 (2,3)	NA	≤0,01 (S/S)	CLSI	34	1(2,9)	1(2,9)	NA	1 (S/S)	CLSI	44	0 (0,0)	2(4,5)	NA	
		EUCAST	19	0 (0,0)	0 (0,0)	NA		EUCAST	14	0 (0,0)	0 (0,0)	NA		EUCAST	19	0 (0,0)	0 (0,0)	NA	
14	32 (R/R)	CLSI	44	3 (6,8)	NA	0 (0,0)	8 (I/R)	CLSI	34	18 (52,9)	NA	NA	1 (S/S)	CLSI	44	0 (0,0)	2(4,5)	NA	
		EUCAST	19	0 (0,0)	NA	0 (0,0)		EUCAST	14	5 (35,7)	NA	0 (0,0)		EUCAST	19	0 (0,0)	1(5,3)	NA	

^a Valores de CMI de referencia de los β -lactámicos obtenidos por los dos laboratorios de referencia con el método manual de microdilución en caldo. Entre paréntesis la categoría clínica según los puntos de corte de CLSI/EUCAST.

^b Número de determinaciones llevadas a cabo para cada combinación de antimicrobiano/cepa por los laboratorios que utilizan los puntos de corte de CLSI o de EUCAST.

^c Número de mE, ME y VME y entre paréntesis los porcentajes, calculados considerando como denominador el número de determinaciones llevadas a cabo.

^d Ausencia de criterio de EUCAST.

^e No aplicable.

Tabla 9. Distribución de las discrepancias en las categorías clínicas por antibiótico analizado (CLSI o EUCAST).

Antibiótico ^a	Criterio	combinación cepa/antibiotico	Nº cepas		Discrepancias categoría clínica		Tipo de errores					
			S	R	n	%	mE		ME		VME	
							n	% ^b	n	% ^c	n	% ^d
AMP	CLSI	540	39	501	1	0,2	0	0	0	0	1	0,2
	EUCAST	260	19	241	1	0,4	1	0,4	0	0	0	0
AMC	CLSI	603	72	408	175	29	154	25,5	6	8,3	15	3,7
	EUCAST	261	38	148	32	12,3	5	1,9	6	15,8	21	14,2
TIC	CLSI	111	6	102	3	2,7	1	0,9	0	0	2	2
	EUCAST	42	3	38	1	2,4	0	0	0	0	1	2,6
PTZ	CLSI	576	363	38	151	26,2	86	14,9	65	17,9	0	0
	EUCAST	246	129	47	70	28,5	4	1,6	60	46,5	6	12,8
CEF ^g	CLSI	594	42	488	57	9,6	51	8,6	1	2,4	5	1
CFZ ^g	CLSI	479	398	62	19	4	10	2,1	6	1,5	3	4,8
CXM	CLSI	578	42	403	101	17,5	99	17,1	0	0	2	0,5
	EUCAST	261	19	200	44	16,9	3	1,1	0	0	41	20,5
FOX ^g	CLSI	836	678	61	97	11,6	8	1	89	13,1	0	0
CTX	CLSI	595	178	377	45	7,6	6	1	35	19,7	4	1,1
	EUCAST	259	69	166	19	7,3	3	1,2	15	21,7	1	0,6
CAZ	CLSI	598	243	237	118	19,7	21	3,5	93	38,3	4	1,7
	EUCAST	260	94	108	57	21,9	54	20,8	3	3,2	0	0
ATM	CLSI	483	139	298	39	8,1	25	5,2	7	5	7	2,3
	EUCAST	191	55	125	14	7,3	10	5,2	1	1,8	3	2,4
FEP	CLSI	600	228	233	140	23,3	58	9,7	70	30,7	12	5,2
	EUCAST	261	88	140	33	12,6	5	1,9	22	25	6	4,3
IPM	CLSI	599	595	0	4	0,7	3	0,5	1	0,2	NA ^e	NA ^e
	EUCAST	265	263	0	2	0,8	0	0	2	0,8	NA ^e	NA ^e
MEM	CLSI	266	266	0	0	0	0	0	0	0	NA ^e	NA ^e
	EUCAST	91	91	0	0	0	0	0	0	0	NA ^e	NA ^e
ETP	CLSI	570	569	0	1	0,2	0	0	1	0,2	NA ^e	NA ^e
	EUCAST	264	255	0	9	3,4	3	1,1	6	2,4	NA ^e	NA ^e
TOTAL ^f	CLSI	8028	3858	3208	951	11,8	522	6,5	374	9,7	55	1,7
	EUCAST	2661	1123	1213	282	10,6	88	3,3	115	10,2	79	6,5
TOTAL		10,689	4,981	4,421	1,233	11,5	610 ^f	5,7	489	9,8	134	3

^aLa nomenclatura de los antibióticos está descrita en el texto. ^bConsiderando el denominador como el número total de determinaciones hechas por antimicrobiano. ^cConsiderando el denominador como el número de cepas sensibles para cada antimicrobiano. ^d Considerando el denominador como el número de cepas resistentes. ^eNA (no aplicable). ^fNúmero y porcentaje total de discrepancias en las categorías clínicas. ^gAusencia de criterio de EUCAST.

Tabla 10. Antimicrobianos más afectados por cada tipo de error y situación responsable de dichos errores o discrepancias.

Errores ^a	Antimicrob, ^b	Nº, errores ^c	Cambios manuales ^d	Errores técnicos ^e	Errores debidos a las técnicas automatizadas y manuales por el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos					Cepas más involucradas en los errores
					MicroScan	Vitek	Wider	Phoenix	Manual	
mE	AMC	159	12 (7,5)	147 (92,5)	75 (51,0)	43 (29,2)	16 (10,9)	10 (6,8)	3 (2,0)	CCSRC01, CCSRC05, CCSRC09
	TZP	92	21 (22,8)	71 (77,2)	37 (52,1)	18 (25,35)	6 (8,45)	5 (7,04)	5 (7,04)	CCSRC08 ⁱ , CCSRC07 ⁱ
	CEF	51	0 (0,0)	51 (100,0)	32 (62,7)	4 (7,8)	8 (15,7)	0 (0,0)	7 (13,7)	CCSRC03, CCSRC07, CCSRC13
	CXM	102	3 (2,9)	99 (97,1)	52 (52,5)	24 (24,2)	15 (15,2)	3 (3,0)	5 (5,1)	CCSRC03, CCSRC07, CCSRC13
	CAZ	75	35 (46,7)	40 (53,3)	21 (52,5)	14 (35,0)	2 (5,0)	0 (0,0)	3 (7,5)	CCSRC01, CCSRC05, CCSRC09, CCSRC11
	ATM	35	16 (45,7)	19 (54,29)	6 (31,6)	2 (10,5)	2 (10,5)	3 (15,8)	6 (31,6)	CCSRC13
	FEP	63	6 (9,5)	57 (90,5)	27 (47,4)	18 (31,6)	9 (15,8)	2 (3,5)	1 (1,7)	CCSRC01 ⁱ
	Total^f	577	93 (16,1)	484 (83,9)	250 (51,6)	123 (25,4)	58 (12,0)	23 (4,7)	30 (6,2)	
ME	AMC	12	12 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	CCSRC07
	TZP	125	112 (89,6)	13 (10,4)	11 (84,6)	2 (15,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	Todas las cepas sensibles a PTZ
	FOX	89	85 (95,5)	4 (4,5)	2 (50,0)	2 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	Todas las cepas menos CCSRC12 y CCSRC14
	CTX	50	17 (34)	33 (66,0)	19 (57,6)	7 (21,2)	4 (12,1)	3 (9,1)	0 (0,0)	CCSRC11
	CAZ	96	77 (80,2)	19 (19,8)	11 (57,9)	2 (10,5)	5 (26,3)	0 (0,0)	1 (5,3)	CCSRC01, CCSRC09, CCSRC11
	ATM	8	3 (37,5)	5 (62,5)	0 (0,0)	1 (20,0)	1 (20,0)	2 (40,0)	1 (20,0)	CCSRC03, CCSRC07
	FEP	92	41 (44,6)	51 (55,4)	39 (76,5)	4 (7,8)	8 (15,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	CCSRC05, CCSRC11
	Total^g	472	347 (73,5)	125 (26,5)	82 (65,6)	18 (14,4)	18 (14,4)	5 (4,0)	2 (1,6)	
VME	AMC	36	0 (0,0)	36 (100,0)	15 (41,7)	17 (47,2)	4 (11,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	CCSRC06, CCSRC10
	TZP	6	0 (0,0)	6 (100,0)	3 (50,0)	0 (0,0)	3 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	CCSRC08
	CFZ	3	0 (0,0)	3 (100,0)	3 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	CCSRC03, CCSRC09
	CXM	43	1 (2,3)	42 (97,8)	21 (50,0)	11 (26,2)	4 (9,5)	4 (9,5)	2 (4,8)	CCSRC03, CCSRC07, CCSRC13
	CAZ	4	1 (25,0)	3 (75,0)	0 (0,0)	3 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	CCSRC10
	ATM	10	1 (10,0)	9 (90,0)	4 (44,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (22,2)	3 (33,3)	CCSRC11
	FEP	18	2 (11,1)	16 (88,9)	7 (43,8)	7 (43,8)	0 (0,0)	2 (12,5)	0 (0,0)	CCSRC11
	Total^h	120	5 (4,2)	115 (95,8)	53 (46,1)	38 (33,0)	11 (9,6)	8 (6,9)	5 (4,3)	
Total^{f+g+h}		1169	445 (38,1)	724 (61,9)	385 (53,2)	179 (24,7)	87 (12,0)	36 (5,0)	37 (5,1)	

^aTipos de errores; ^bantimicrobianos más afectados por los *minor* (mE), *major* (ME) y *very major* (VME) *errors* (incluidos los resultados interpretados con los criterios de CLSI y de EUCAST); ^cnúmero total de errores por antibiótico dentro de cada tipo de error; ^derrores que se deben a modificaciones manuales por el microbiólogo cuando interpreta la presencia de un mecanismo de resistencia determinado; ^eerrores debidos a las técnicas automatizadas y manuales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos; errores totales del tipo mE^f, ME^g y VME^h; ⁱcombinación antimicrobiano/cepa en la que los errores son exclusivamente debidos a los diferentes puntos de corte del CLSI y EUCAST (ver tabla 8).

Tabla 11. Distribución de los errores en las categorías clínicas por cepa estudiada y por centros que utilizan el criterio de CLSI o de EUCAST.

Cepas	Porina/ β -lactamasa	Criterio	Nº análisis ^a	Total errores ^b		mE		ME		VME	
				<i>n</i>	%	<i>n</i>	% ^c	<i>n</i>	% ^c	<i>n</i>	% ^c
CCSRC01	OmpF ⁺ /CTX-M-1	CLSI	596	119	20,0	71	11,9	48	8,1	0	0,0
		EUCAST	199	28	14,1	18	9,0	7	3,5	3	1,5
CCSRC02	OmpF ⁻ /CTX-M-1	CLSI	572	47	8,2	34	5,9	13	2,3	0	0,0
		EUCAST	196	8	4,1	0	0,0	7	3,6	1	0,5
CCSRC03	OmpF ⁻ /CTX-M-1 _{S130G}	CLSI	578	78	13,5	51	8,8	21	3,6	6	1,0
		EUCAST	195	23	11,8	4	2,1	6	3,1	13	6,7
CCSRC04	OmpF ⁻ /CTX-M-1 _{S237G}	CLSI	588	29	4,9	11	1,9	17	2,9	1	0,2
		EUCAST	194	9	4,6	0	0,0	8	4,1	1	0,5
CCSRC05	OmpF ⁺ /CTX-M-15	CLSI	574	62	10,8	8	1,4	52	9,1	2	0,3
		EUCAST	194	45	23,2	19	9,8	26	13,4	0	0,0
CCSRC06	OmpF ⁻ /CTX-M-15	CLSI	543	58	10,7	42	7,7	13	2,4	3	0,6
		EUCAST	193	18	9,3	1	0,5	5	2,6	12	6,2
CCSRC07	OmpF ⁻ /CTX-M-15 _{S130G}	CLSI	572	88	15,4	77	13,5	10	1,7	1	0,2
		EUCAST	182	21	11,5	1	0,5	6	3,3	14	7,7
CCSRC08	OmpF ⁻ /CTX-M-15 + OXA-1	CLSI	586	65	11,1	47	8,0	11	1,9	7	1,2
		EUCAST	193	10	5,2	1	0,5	3	1,6	6	3,1
CCSRC09	OmpF ⁺ /CTX-M-14	CLSI	582	90	15,5	31	5,3	48	8,2	11	1,9
		EUCAST	183	24	13,1	16	8,7	6	3,3	2	1,1
CCSRC10	OmpF ⁻ /CTX-M-14	CLSI	528	53	10,0	28	5,3	13	2,5	12	2,3
		EUCAST	159	11	6,9	1	0,6	9	5,7	1	0,6
CCSRC11	OmpF ⁻ /CTX-M-14 _{K234R}	CLSI	559	129	23,1	23	4,1	99	17,7	7	1,3
		EUCAST	193	48	24,9	19	9,8	20	10,4	9	4,7
CCSRC12	ATCC 25922	CLSI	584	2	0,3	0	0,0	2	0,3	0	0,0
		EUCAST	192	2	1,0	1	0,5	1	0,5	0	0,0
CCSRC13	IRT-2	CLSI	585	93	15,9	72	12,3	19	3,2	2	0,3
		EUCAST	193	19	9,8	1	0,5	3	1,6	15	7,8
CCSRC14	CMY-2	CLSI	582	38	6,5	27	4,6	8	1,4	3	0,5
		EUCAST	194	14	7,2	6	3,1	6	3,1	2	1,0
Total		CLSI	8,028	951	11,8	522	6,5	374	4,7	55	0,7
		EUCAST	2,661	282	10,6	88	3,3	115	4,3	79	3,0
		10,689	1233	11,5	610	5,7	489	4,6	134	1,3	

^aNúmero de determinaciones para cada cepa (teniendo en cuenta todos los antimicrobianos) por centros que utilizan CLSI o EUCAST. ^bNúmero total de errores, incluyendo todos los antimicrobianos estudiados. ^cLos porcentajes de mE, ME y VME se calcularon usando como denominador el número de determinaciones realizadas por cepa.

Mecanismos de resistencia inferidos en las cepas del estudio por los laboratorios participantes.

Podemos observar en la **Figura 10** una representación gráfica de los mecanismos de resistencia inferidos por los laboratorios participantes. Los resultados para las cepas controles fueron los siguientes: i) la cepa de *E. coli* ATCC 25922 (CCSRC12) mostró un fenotipo sensible a todos los antimicrobianos en todos los laboratorios; ii) la cepa productora de IRT-2 (CCSRC13) fue asociada con la producción de IRTs (54.0%, 34/63) o con una hiperproducción de TEM-1/2 (20.6%, 13/63); iii) la cepa productora de la β -lactamasa plasmídica CMY-2 (CCSRC14) fue identificada como productora de una AmpC en un 90.5% (57/63) de los casos, 7.9% (5/63) infirieron una asociación de BLEE con una AmpC cromosómica y un 1.9% (1/63) no informaron ningún mecanismo de resistencia aunque la cepa era resistente a AMC, FOX y CAZ. Las cepas productoras de CTX-M salvajes con/sin expresión de la porina de membrana OmpF (CCSRC01, CCSRC02, CCSRC05, CCSRC06, CCSRC09 y CCSRC10), se identificaron en un 91.8% (335/365) de las ocasiones como productoras de BLEE; en un 5.5% (20/365), a una producción de BLEE asociado a otro mecanismo de resistencia [hiperproducción de TEM-1 y/o alteraciones de las porinas de membrana, OXA-1 o IRT]; en 6 casos (1.6%, 6/365) se infirieron fenotipos erróneos (4 veces se encontró un resultado BLEE negativo y 2 veces infirieron una producción de carbapenemasas).

Para las cepas deficientes en la porina OmpF y portadoras de CTX-M con los cambios S130G [fenotipo *IR*-CTX-M, ya que presentan resistencia a BLiBL pero hipersensibilidad a oximinocefalosporinas], o S237G y K234R (fenotipos *CM*-CTX-M, ya que presentan resistencia de bajo nivel a BLiBLs y mantienen la resistencia a oximinocefalosporinas), se obtuvieron resultados diferentes:

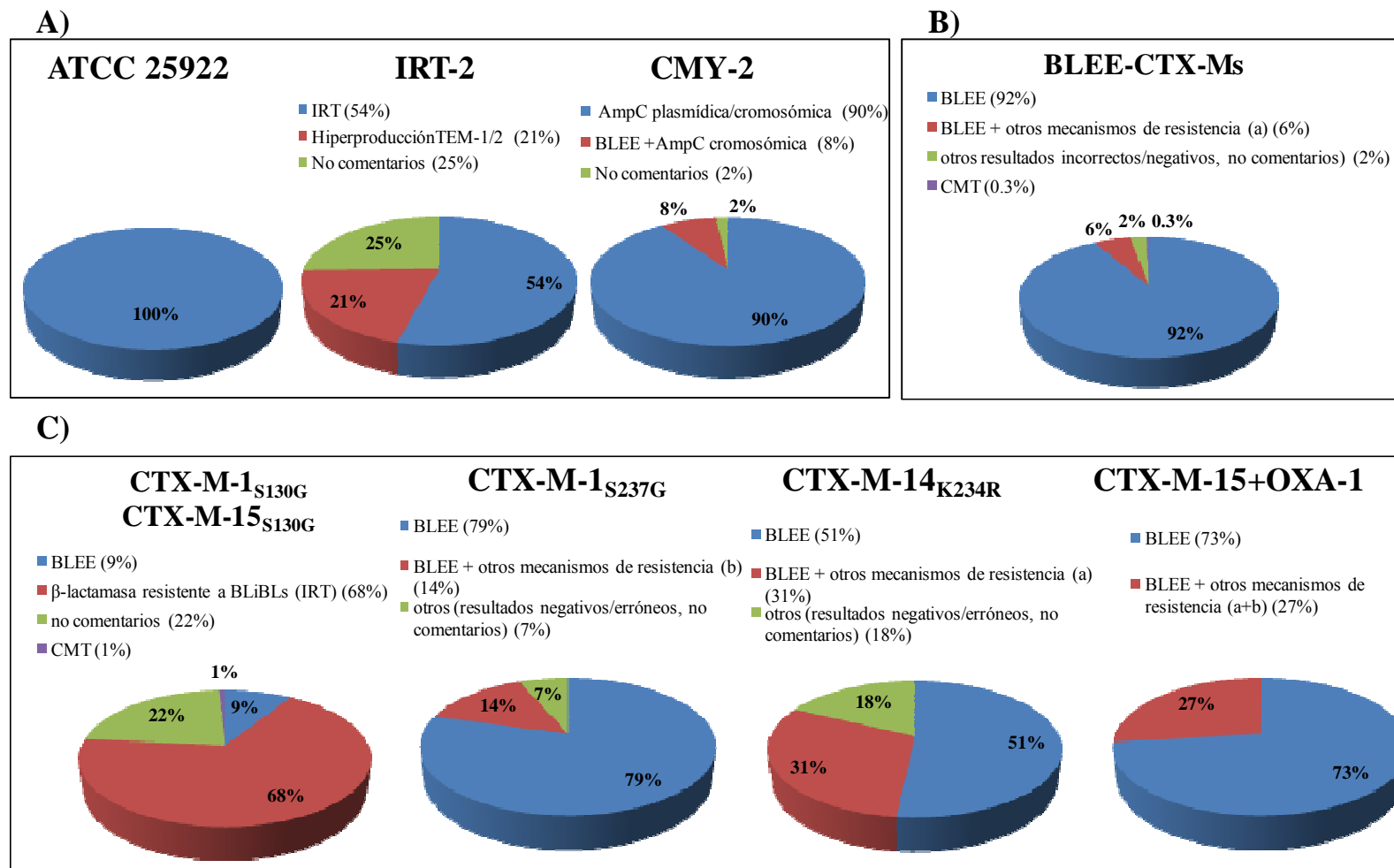
i) Las cepas con los genes *bla*_{CTX-M-1-S130G} y *bla*_{CTX-M-15-S130G} (CCSRC03 y CCSRC07, respectivamente), correspondientes a los fenotipos *IR*-CTX-M, se identificaron en un 67.7% (84/124) de los casos como productores de β -lactamasas resistentes a inhibidores (mayoritariamente como IRTs), en 12 ocasiones se atribuyeron fenotipos erróneos 9.7% (12/124): un 8.9% relacionó el fenotipo con la producción de BLEE (aunque las cepas mostraron resistencia a AMC y PTZ) y un laboratorio (0.8%) informó una producción de

CMT debido a la co-resistencia frente a CTX y a BLiBLs y, por último, un 22.6% (28/124) no comentó nada sobre el mecanismo de resistencia.

ii) Las dos cepas con los genes *bla*_{CTX-M-1S237G} y *bla*_{CTX-M-14K234R} (CCSRC04 y CCSRC11 respectivamente), correspondientes con un fenotipo (CM-CTX-M), a pesar de que en muchos casos, las CMIs a AMC y TZP estaban en la categoría de intermedio-resistente, se identificaron mayoritariamente como cepas productoras de BLEEs [un 79.4%, (50/63) en el caso de la cepa portadora del gen *bla*_{CTX-M-1-S237G} (CCSRC04) y un 51.6% (32/62) en la cepa portadora del gen *bla*_{CTX-M-14-K234R} (CCSRC11)]. Aunque ningún centro participante sugirió la presencia de fenotipos *CM* (*complex-mutant*), se infirió una asociación entre una BLEE y otros mecanismos de resistencia [para la cepa CCSRC04 en un 14.3% (9/63) de los casos y en la cepa CCSRC11 en un 30.6% (19/62)] como la hiperproducción de TEM o de β -lactamasa cromosómica AmpC; OXA-1 o IRT, o simplemente BLEE resistente a AMC. Por último, se informaron fenotipos erróneos [para la cepa CCSRC04, 1.6% (1/63) se dio un resultado BLEE negativo y en un 11.1% (7/63) se comunicó la presencia de una penicilinasa (7.9%) y, en el caso de la cepa CCSRC11, ningún mecanismo de resistencia fue inferido (3.2%)] y ningún comentario sobre el mecanismo de resistencia [4.8% (3/63) y 6.4% (4/62), respectivamente].

Finalmente, para la cepa CCSRC08, portadora de 2 mecanismos enzimáticos (CTX-M-15 y OXA-1) responsables de los fenotipos BLEE y resistencia a inhibidores, más un mecanismo de impermeabilidad (pérdida de ompF), sólo un 27.0% (17/63) de los centros infirieron una asociación de BLEE y otro mecanismo de resistencia (hiperproducción de TEM o de la β -lactamasa cromosómica AmpC; OXA o IRT), mientras que un 73.0% lo identificó como productor de BLEE (a pesar de mostrar resistencia a AMC).

Figura 10. Mecanismo de resistencia inferido por los laboratorios participantes. A) Cepas control; B) cepas portadoras de BLEE-CTX-M salvajes; C) variantes de CTX-M con susceptibilidad reducida a BLiBLs. Otros mecanismos de resistencia: (a)- TEM-1/2, OXA-1/IRT, hiperproducción de TEM, alteración porinas; (b)- AmpC cromosómica/hiperproducción de TEM hiperexpresión. En el caso de las cepas productoras de las variantes de CTX-M, los centros informaron una producción de BLEE a pesar de mostrar resistencia a BLiBLs.



Recomendaciones acerca del tratamiento.

Para las cepas productoras de CTX-M salvajes (CCSRC01, CCSRC02, CCSRC05, CCSRC06, CCSRC09 y CCSRC10), la mayoría de los centros (46/64) no incluyeron recomendaciones terapéuticas. Siete centros recomendaron carbapenems como única opción, cuatro centros carbapenem o BLiBLs, según el foco de infección, el inóculo y la situación clínica del paciente. Sin embargo, un centro desaconsejó el uso de BLiBLs por la ausencia de estudios que confirmen su utilidad clínica y advirtieron de un posible fallo terapéutico en bacteriemias de origen no urinario. Otras opciones terapéuticas indicadas fueron: fosfomicina intravenosa, cefalosporinas de espectro ampliado, carbapenems o BLiBLs combinados con fluoroquinolonas o aminoglucósidos.

Para las cepas con fenotipo *IR*-CTX-M (CCSRC03 y CCSRC07) e IRT (CCSRC13), solo 13 centros comentaron opciones terapéuticas, siendo los antimicrobianos más recomendados cefalosporinas de amplio espectro o carbapenems y como alternativa fluoroquinolonas y gentamicina. En el caso de las cepas con fenotipo *CM*-CTX-M (CCSRC04, CCSRC11 y CCSRC08), se identificaron mayoritariamente como productores de BLEEs, con lo que el tratamiento fue el mismo que el comentado anteriormente (carbapenems solo o en combinación con otros antimicrobianos).

Finalmente, para la cepa productora de CMY-2 (CCSRC14), los pocos centros (n=7) que hicieron recomendaciones de tratamiento sugirieron el FEP (n=4) u otros como la tigeciclina(n=1), TZP (n=1) o un carbapenem(n=1).

Discusión

El aumento en la complejidad, la diseminación y las implicaciones clínicas de los mecanismos de resistencia, hacen que el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos sea una de las funciones más importantes desarrolladas en los laboratorios de Microbiología⁽¹¹²⁾. Para detectar e identificar correctamente los mecanismos de resistencia y poner tratamientos terapéuticos adecuados, los controles de calidad son muy útiles para valorar la competitividad en estas funciones. La continua descripción de nuevos mecanismos de resistencia que complican la interpretación de los fenotipos de sensibilidad, obliga a aquellas personas que realizan habitualmente ese trabajo en sus respectivos centros de Microbiología clínica a someterse a una continua revisión de sus procedimientos de interpretación. Esa es la finalidad de controles de calidad como el presentado aquí. La idea de realizar este control de calidad surgió a partir de la obtención bajo condiciones *in vitro* (con facilidad),⁽²¹⁴⁾ variantes en todos los grupos de CTX-M con sensibilidad disminuida a BLiBLs. Estas variantes muestran fenotipos *IR*-CTX-M (aquella variantes CTX-M con el cambio S130G) y *CM*-CTX-M (en aquellas variantes CTX-M con los cambios S237G o K234R) similares a otras β -lactamasas como IRTs^(26,127), *IR*-SHV [InhibitorResistant SHV,^(81,143,156,209)] e *IRKO*-1 y derivados de *OXY*-2⁽²³³⁾.

En un estudio multicéntrico reciente en España⁽¹⁸⁵⁾ los mecanismos de resistencia más prevalentes encontrados en cepas clínicas resistentes a AMC fueron la presencia de *OXA*-1 asociada en muchos casos a CTX-M-15, seguido de hiperexpresión de penicilinas, presencia de *AmpC* plasmídica, hiperexpresión de *AmpC* cromosómica y presencia de IRTs. Dentro de este estudio no se identificaron cepas *IR*-CTX-M. Sin embargo en otro estudio multicéntrico realizado en EEUU, un 4% de las cepas de *E. coli* resistentes a BLiBLs no mostraron ninguno de los mecanismos descritos y conocidos, sugiriendo los autores que nuevos mecanismos podrían ser descritos. En ese trabajo específicamente los autores llaman la atención al hecho de no haber buscado la presencia de genes CTX-M⁽¹¹⁸⁾. Por otra parte, su falta de detección podría ser más bien un problema relacionado con la metodología o con la interpretación del patrón de resistencia de los aislados clínicos⁽¹⁹⁹⁾.

En el estudio de control de calidad, un porcentaje importante de laboratorios identifican como BLEE el mecanismo de resistencia en el caso de las cepas portadoras de CTX-M_{S130G},

CTX-M_{K234R} y CTX-M_{S237G}, (8.9%, 51.6%, y 79.4%, respectivamente), que a pesar de que presentan resistencia a BLiBLs, no se hace ningún comentario y no formarán parte de los estudios de vigilancia y caracterización de los mecanismos de resistentes a BLiBL en Enterobacterias. Confirmando nuestras sospechas, las cepas productoras de CTX-M_{S130G} se identificaron en un 67.7% como penicilinasas resistentes a inhibidores, mayoritariamente como IRTs. En cambio, en las cepas con las variantes CTX-M_{K234R} y CTX-M_{S237G} se atribuyó una combinación de BLEE y otro mecanismo de resistencia para justificar el incremento de la CMI a inhibidores (30.7% y 14.3%, respectivamente), nunca sospechando un fenotipo CM-CTX-M. De hecho, ese fenotipo debería ser el que se informase para intentar detectar estas variantes si existieran [sólo se informó la presencia de un fenotipo CM en dos casos: una cepa portadora de una CTX-M salvaje (CCSRC10) y de CTX-M_{S130G} (CCSRC03), ambas en contexto OmpF⁻].

Se deberían completar los estudios vigilancia epidemiológica incluyendo cepas con fenotipos BLEE y sensibilidad disminuida a BLiBL en aislados clínicos para tener un conocimiento más exacto de su aparente ausencia en clínica, pero para ello debe informarse cuando hay resistencia a BLiBLs.

En relación a los puntos de corte, previamente en España solo se utilizaban los del CLSI, pero cada vez más se están introduciendo los de EUCAST [24% en nuestro estudio, comparado con un 14% en un estudio reciente ⁽¹¹³⁾ y 0% en estudios anteriores ^(45,59)]. En general, las tasas de error fueron ligeramente mayores en los centros que utilizaron el criterio de CLSI (11,8%) que en los que utilizaron EUCAST (10,6%), excepto para los VMEs (3.0 % de discrepancias en comparación a un 0.7% en centros que utilizaron CLSI).

Es importante resaltar que la mayoría de los centros (80%) realizan modificaciones de las categorías clínicas (de S a I o R) cuando infieren un determinado mecanismo de resistencia, y representan un 38.1% de todas las discrepancias para los antibióticos más afectados (**tabla 11**). Durante muchos años se recomendaron estas modificaciones ante la presencia de una BLEE, asumiendo que los puntos de corte no eran adecuados ⁽¹²⁶⁾. Sin embargo, con los nuevos puntos de corte establecidos por los criterios de CLSI y de EUCAST para *Enterobacteriaceae* ^(56,252), las cefalosporinas de espectro ampliado deben informarse sin modificar, así se podrán tener más opciones terapéuticas y se prevendrá el

consumo elevado de carbapenems. Además con esta recomendación, no es necesario realizar tests para confirmar la presencia de BLEE que retrasan los resultados de sensibilidad a antimicrobianos ⁽¹²⁶⁾.

En este estudio, los carbapenems fueron recomendados como tratamiento para las cepas productoras de BLEE y únicamente 2 laboratorios recomendaron cefalosporinas de espectro ampliado, siguiendo las recomendaciones de CLSI y EUCAST. En muchas ocasiones, no se informa cuando hay resistencia a BLiBLs, hecho importante en el caso de variantes de CTX-M con sensibilidad disminuida a estos compuestos, porque incluso en algún caso, se recomiendan como tratamiento (dependiendo del foco de infección, del inóculo y de la situación clínica del paciente). Si nos fijamos en las CMIs de estas variantes (**tabla 7**), la TZP se podría recomendar como tratamiento en el caso de los variantes CM-CTX-M (CTX-M_{K234R, S237G}), pero no AMC. El tratamiento con BLiBLs estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en trabajos recientes tanto *in vitro* como *in vivo* y en un estudio clínico ^(79,140,217). En cualquier caso, lo que se debería hacer es informar de la resistencia a BLiBLs cuando se observe, aunque no se conozcan exactamente los mecanismos de resistencia responsables de ese fenotipo ⁽²¹⁷⁾. Este problema también se detectó para la cepa productora de CTX-M-15 más OXA-1 al identificarse mayoritariamente (73.2%) como BLEE a pesar de mostrar resistencia a AMC y TZP. Este resultado resulta preocupante ya que recientemente en las bacteriemias por *E. coli* resistentes a BLiBL hay una asociación con OXA-1 ⁽²¹⁹⁾.

En resumen, los fenotipos de resistencia encontrados en las cepas productoras de las variantes de CTX-M (*IR*-CTX-M o *CM*-CTX-M) se confunden con otros mostrados por otros mecanismos de resistencia, como enzimas IRT, OXA-1, BLEE, o hiperexpresión de penicilinasa TEM-1. La mayoría de los centros (80%) sigue procedimientos que no están recomendados actualmente por los comités del CLSI y de EUCAST, lo que puede llevar a un abuso de ciertos antibióticos (como los carbapenems) y esto, a su vez provocar la selección de mecanismos de resistencia nuevos y el mantenimiento de otros que ya se han establecido, como las carbapenemasas ⁽²¹⁴⁾.

CAPÍTULO 3.

Farmacodinámica de la selección de *E. coli* productores de CTX-M con resistencia a BLiBLs: predicción de la respuesta clínica basada en estudios de cinética de muerte.

Introducción

1. Infecciones debidas a cepas productoras de BLEEs.

La mortalidad global asociada a bacteriemia oscila entre 20% para infecciones causadas por *E. coli* y 20-50% para *K. pneumoniae* ⁽²⁶⁵⁾, lo que refleja la necesidad de instaurar un tratamiento antibiótico eficaz con rapidez. Las cefalosporinas de amplio espectro, como CTX y CAZ, se recomendaron como tratamiento durante mucho tiempo, sin embargo la selección y dispersión de cepas productoras de BLEE cambió este criterio. Entre 1998-2002 la *National Nosocomial Infection Surveillance* comunicó unos datos de resistencia a cefalosporinas de 3ª generación de 0.4% para *E. coli* y 1.8% para *K. pneumoniae* en bacteriemias de origen nosocomial ⁽¹⁷¹⁾. Estos porcentajes han ido incrementándose exponencialmente en todos los países (en 2006 un 6% en España o en 2011 un 15% en Corea del sur) ^(115,224). Progresivamente las cepas portadoras de BLEE fueron apareciendo también en las bacteriemias de origen nosocomial, coincidiendo con la aparición de las β -lactamasas de tipo CTX-M. Actualmente el 7,5% de las bacteriemias adquiridas en la comunidad son causadas por bacterias productoras de BLEE ⁽²¹⁸⁾, y de éstas entre el 65-90% de las ocasiones, el fenotipo BLEE es debido a la presencia de β -lactamasas de tipo CTX-M ^(60,116,179). La emergencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en la comunidad es uno de los cambios epidemiológicos más significativos de la resistencia antibiótica de los últimos años ⁽¹⁸⁷⁾.

2. Elección del tratamiento en las infecciones por cepas productoras de BLEE.

La presencia de cepas productoras de BLEE complica la elección de antibióticos adecuados de manera empírica ya que frecuentemente estas cepas se asocian con patrones de multirresistencia a varios antibióticos, especialmente a fluoroquinolonas y cotrimoxazol ^(132,179,218).

Las cepas productoras de BLEE son generalmente sensibles a BLiBLs como ya se observó en los primeros estudios *in vitro* ⁽¹⁹³⁾. Una razón principal para este hecho es que, como se presenta en el capítulo 1 de esta Tesis Doctoral, los ensayos de evolución realizados muestran que las variantes de CTX-M obtenidas presentan un antagonismo pleiotrópico

(resistencia a cefalosporinas de espectro ampliado y sensibilidad frente a BLiBLs y viceversa) lo que hace difícil su emergencia en ambientes con alto nivel de utilización tanto de cefalosporinas como de inhibidores. Sin embargo, el tratamiento con BLiBLs de infecciones causadas por BLEEs fue inicialmente desestimado por la descripción de el efecto inóculo, en el caso de PTZ ^(140,253), que aun así resultaba ser la combinación más efectiva de los BLiBLs para las infecciones por *E. coli* productores de BLEE ⁽¹⁹⁷⁾.

En diferentes series los carbapenems permanecen activos frente a las cepas de *E. coli* productoras de BLEE; por lo que el tratamiento con carbapenems para las infecciones causadas por microorganismos productores de BLEE fue y es el tratamiento de elección ⁽¹⁹⁸⁾.

3. Alternativas terapéuticas para el tratamiento de infecciones en que se sospechan β -lactamasas de espectro ampliado: posibles consecuencias.

El creciente uso de carbapenems como terapia de primera elección para el tratamiento de bacteriemias en las que se puedan sospechar bacterias con BLEEs, ha generado un incremento de cepas resistentes ^(42,192,228), de la diversidad de tipos de carbapenemasas no previamente descritas, como KPC, o NDM ^(66,122) e incluso situaciones de brotes epidémicos por algunas variantes concretas como OXA-48 ^(190,258), no imaginables en los años previos. Esta situación ha generado la necesidad de buscar estrategias terapéuticas alternativas ⁽⁹¹⁾. Como alternativas para el tratamiento de infecciones por cepas productoras de BLEEs, en el momento actual se encuentra en fase de re-análisis la eficacia terapéutica de los BLiBLs, aunque dicho tratamiento es todavía controvertido. Se aducen varios argumentos en contra de utilizar estos compuestos en la práctica clínica: i) cuando el inóculo bacteriano alcanza 10^7 ufc/ml, situación que incrementa la CMI de PTZ ^(79,140); ii) si las poblaciones bacterianas pueden presentar otros mecanismos de resistencia frente a estos compuestos, como producción AmpC plasmídica, hiperproducción de AmpC cromosómica o de TEM-1, producción de OXA-1 o presencia de β -lactamasas tipo TEM o SHV con capacidad para conferir resistencia a BLiBL (IRT y IR-SHV); iii) los datos clínicos que hay sobre el uso de BLiBLs en el tratamiento de infecciones por bacterias productoras de BLEEs son todavía contradictorios ⁽¹⁹³⁾.

Por un lado, existen estudios que muestran resultados positivos en cuanto al tratamiento con BLiBLs ^(79,107,123,217,220) y, por otro lado, hay estudios en los que se refleja un fallo terapéutico ^(263,271). Parece que el éxito o el fracaso en el tratamiento podría estar relacionado con el nivel de resistencia de las cepas productoras de la infección, y con la localización de la misma. Si el foco de infección es urinario, no hay fracaso terapéutico independientemente del valor de CMI, pero si el foco infeccioso es diferente al urinario, cuando hay niveles altos de resistencia pueden llegar a producirse infecciones graves y sostenidas, en las que se ha alcanzado ocasionalmente un 50% de mortalidad ⁽²¹¹⁾.

Objetivo

El objetivo del 3^{er} capítulo de esta Tesis es el de analizar la aparición espontánea de resistencia de alto nivel a PTZ mediante experimentos *in vitro* de "cinéticas de muerte" en *E. coli* productores de CTX-M, simulando infecciones con bajo inóculo. En caso de ocurrir, determinar si existen constricciones biológicas para la selección *in vivo* de esas variantes con alto nivel de resistencia.

Materiales y métodos

Cepas y construcciones plasmídicas.

La cepa de laboratorio *E. coli* MKW505 [OmpF⁺; OmpC⁺⁽²²⁷⁾], portadora de las construcciones plasmídicas pBGS18-*bla*_{CTX-M-15S130G}; pBGS18-*bla*_{CTX-M-15}-*bla*_{OXA-1}, ya descritas en los capítulos I y II de esta Tesis, se utilizaron para realizar los experimentos. Además la cepa isogénica de MKW505, *E. coli* MH621 [OmpF⁻, OmpC⁺⁽²²⁷⁾] portadora de la construcción plasmídica pBGS18-*bla*_{CTX-M-15} fue también utilizada en esta parte del trabajo.

Estudio de las CMIs.

Los valores de CMIs fueron determinados con tiras de Etest (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) y los antimicrobianos estudiados fueron PTZ, FOX y CHL antes y después de los experimentos de cinética de muerte. Puntualmente también se utilizaron discos de PTZ. Las cepas de *E. coli* utilizadas como controles fueron las recomendadas por CLSI y EUCAST^(56,251): ATCCs 25922 y 35218.

Experimentos de cinética de muerte o curvas de muerte.

Las cepas de *E. coli* MKW505 (productoras de las β -lactamasas CTX-M-15_{S130G} o CTX-M-15+OXA-1), así como *E. coli* MH621 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15}), se incubaron durante 24h en LB líquido en presencia de Kan (50 μ g/ml) como marcador-selector de la presencia del plásmido. Al día siguiente, del cultivo en fase estacionaria ($\sim 10^8$ ufc/mL) se hizo una dilución 1:10³ en 20 ml de LB líquido suplementado con diferentes concentraciones de PTZ dependiendo de la enzima, para tener una densidad bacteriana inicial de 10⁵ ufc/ml y evitar un efecto inóculo⁽¹⁴⁰⁾. La cepa MH621 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15}), sensible a PTZ según los puntos de corte de CLSI y EUCAST (CMI de 1 μ g/ml) fue sometida a concentración de 16/4 μ g/ml de PTZ. La cepa MKW505 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15S130G}, con CMI de 32/4-48/4 μ g/ml) categorizada como cepa "resistente" según criterios de EUCAST, pero como "intermedio" según criterios de CLSI (es resistente con valores de CMI $\geq 128/4$ μ g/ml) fue crecida a 96/4 μ g/ml. Finalmente la cepa MKW505 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15}+*bla*_{OXA-1}) con un valor de CMI inicial de 16 μ g/ml (el valor umbral de resistencia para EUCAST, pero sensible a PTZ según criterios CLSI), fue expuesta a un valor de 4 veces la CMI (64 μ g/ml), porque según los modelos farmacocinéticos y farmacodinámicos, el éxito

microbiológico (eliminación del agente infeccioso) con antibióticos β -lactámicos [la eficiencia bactericida es tiempo-dependiente⁽²⁴⁴⁾] ocurrirá cuando la concentración del antibiótico sea superior a la CMI en el 90-100% del intervalo de dosis y para alcanzar esta premisa, la concentración administrada debe ser 4x la CMI por infusión continua, como ocurre en unidades de cuidados intensivos^(2,244). Los cultivos se incubaron a 37°C con agitación a 170 rpm, realizándose un recuento de viables en placas de LB libre de antibióticos a los tiempos: 0 min, 1 h, 2 h, 3h, 4 h, 5h, 6h, 7h, 8h y 24 h. Los clones capaces de crecer después de 8h, fueron recuperados y estudiados posteriormente.

Experimentos para estudiar la estabilidad del mecanismo de resistencia seleccionado.

Los variantes de la cepa MKW505 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15S130G}) obtenidos en el experimento de curva de muerte con valores de CMI_{PTZ} superiores a la cepa ancestral (antes del ensayo) fueron sometidos a 2 tipos de controles con el objetivo de: i) comprobar si la población evolucionada mantenía estable la resistencia a PTZ y descartar la presencia de un efecto de crecimiento bacteriano por pérdida de actividad del antibiótico o el inhibidor, para ello se incubaron nuevamente 2 clones evolucionados en presencia de la misma concentración de PTZ (96 μ g/ml) utilizada en el ensayo inicial; ii) determinar la estabilidad del fenotipo seleccionado; para ello se aislaron 8 clones evolucionados (para los que se determinaron nuevamente las CMI_{PTZ}). Se realizaron pases seriados (fuerte factor dilución 1:100.000 para evitar selección de mutantes durante el experimento) en LB suplementado con Kan (50 μ g/ml) durante 3 días (ver **figura 11**). La actividad de la Kan se comprobó al inicio y al final del experimento. Cada día se inocularon placas de LB con y sin PTZ (64 μ g/ml). Se realizó diariamente recuentos de viables para diferenciar la población con alta resistencia de la población con sensibilidad disminuida (si pudiese emerger). Al final del 3^{er} día de experimento, se evaluaron las CMIs a PTZ de 2 clones pertenecientes a cada una de las 8 poblaciones y se cuantificaron las dos subpoblaciones.

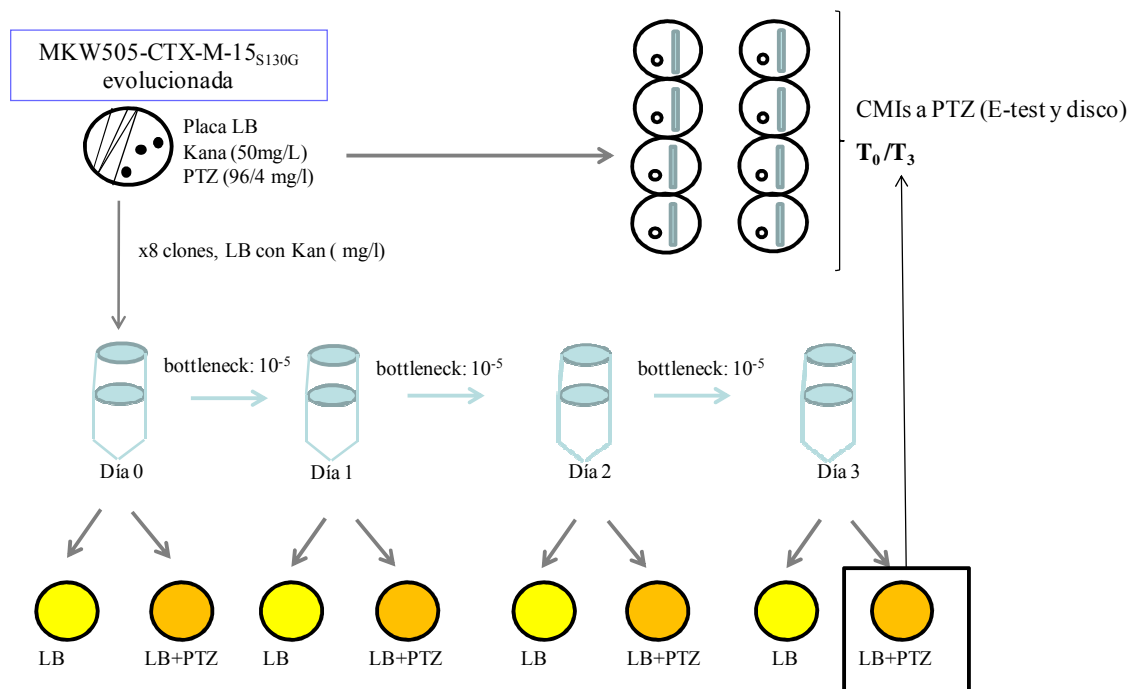


Figura 11. Experimentos para estudiar la estabilidad del mecanismo de resistencia.

Experimentos para evaluar dónde se encuentra el mecanismo de alta resistencia en la población evolucionada.

Con el fin de establecerse los cambios mutaciones implicados en los fenotipos de alta resistencia de las cepas evolucionadas a altas concentraciones del antibiótico PTZ, se realizaron varios experimentos con la cepa portadora de la enzima CTX-M-15_{S130G} (**ver figura 12**); i) para analizar si la resistencia se encuentra en el plásmido; a tal fin se extrajo el plásmido de 2 clones evolucionados (QIAprepSpin Miniprep Kit, Quiagen, GmbH, Hilden, Germany) y se transformaron en la cepa original (MKW505), libre de plásmido. Se estudiaron las CMI's frente a PTZ, FOX y CHL; ii) para inferir si la resistencia se encontraba en el ADN cromosómico; para ello los mismos clones fueron sometidos a pases seriados en LB para segregar del plásmido (30 réplicas de cada uno de los clones hasta obtener un clon sensible a Kan) y poder calcular los valores de CMI en la cepa evolucionada libre de plásmido. En cuatro réplicas de cada clon que mostraron sensibilidad a Kan en el día 4, se determinaron las CMI's a los mismos antibióticos anteriormente citados.

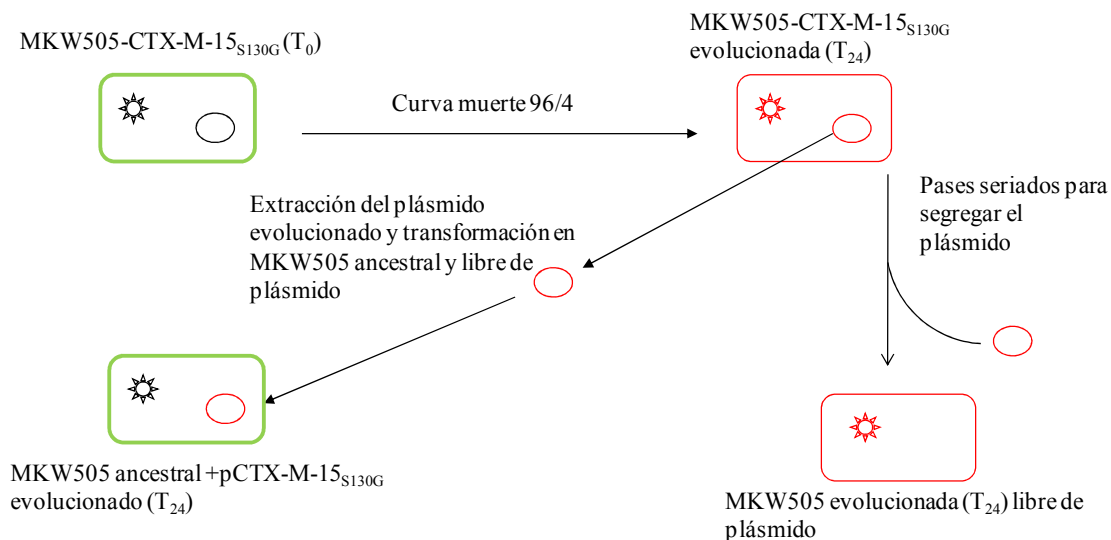


Figura 12. Experimentos para analizar dónde se encuentra el mecanismo de resistencia.

Estudio de curvas de crecimiento.

Se estudiaron las curvas de crecimiento en LB de las cepas de *E. coli* MKW505 productoras de CTX-M-15_{S130G} (ancestral y evolucionadas), así como de las combinaciones descritos en el apartado anterior (cepa MKW505 ancestral con pBGS18-*bla*_{CTX-M-15S130G} evolucionado y cepa MKW505 evolucionada, libre de plásmido), utilizando el sistema Bioscreen C de Labsystems (incubación a 37°C, durante 24h y midiendo la OD₆₀₀ cada 10 min). Las tasas de crecimiento se calcularon con los valores de las densidades ópticas correspondientes al crecimiento exponencial y con ello se calculó el *fitness* relativo. Para este fin, las tasas de crecimiento relativas se calcularon como el cociente entre las tasas de crecimiento de los clones evolucionados, transformantes y sin plásmidos, entre las de los clones no evolucionados (T₀).

PCR y secuenciación.

Se estudiaron los genes de las porinas y de sus principales reguladores (*ompF*, *ompC*, *envZ* y *ompR*). Los cebadores utilizados para la amplificación completa de los genes fueron: *ompC*-Fwd 5'-GACTTGCCGACTGATTAATGA-3'; *ompC*-Rv 5'-TACAGAAGGCTGAGGGCATA-3'; *ompF*-Fwd 5'-CGGTGTTACAAAGTTCCT-3';

ompF-Rv 5'-GTGAGATTGCTCTGGAAG-3'; *envZ*-Fwd 5'-CCGCATGGTGGGAAGAAGATC-3'; *envZ*-Rv 5'-GCTGGTCCGAAACTGTAATG-3'; *ompR*-Fwd 5'-CACATTGGGTATAACGTGATC-3' y *ompR*-Rv 5'-CAACATACGCACTTCGTACG-3'. Se extrajo ADN genómico (QIAamp DNA Mini Kit; Quiagen, GmbH, Hilden, Germany) de 6 clones portadores de los genes *bla*_{CTX-M-15S130G} y *bla*_{CTX-M-15+OXA-1} evolucionados a las 24 h de los experimentos de las "curvas de muerte". Las secuencias se compararon con las de los genes de las cepas no evolucionadas a tiempo 0 de los experimentos. Los productos de PCR fueron purificados con el kit de purificación: ExoSAP-IT® purification kit USB Corp., Cleveland, OH, EEUU y posteriormente secuenciados.

Resultados

Experimentos de cinética de muerte.

En la **figura 13** se puede ver la representación de las ufc/ml a lo largo de 24h, para las cepas MKW505 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15-S130G}), MKW505 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15}+*bla*_{OXA-1}) y MH621 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15}) en presencia de una concentración de PTZ correspondiente a 96/4 µg/ml, 64/4 µg/ml y 16/4 µg/ml respectivamente.

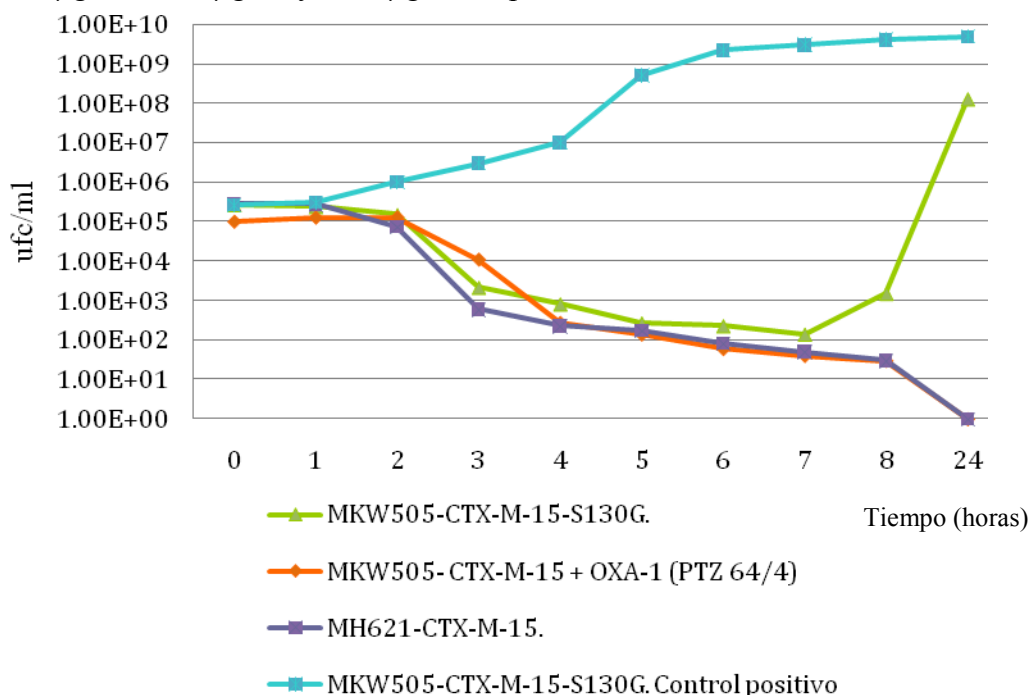


Figura 13. Curvas de muerte de las cepas de *E. coli* portadoras de CTX-M-15_{S130G}, CTX-M-15+OXA-1 y CTX-M-15 en presencia de PTZ a una concentración de 96/4 µg/ml, 64/4 µg/ml y 16/4 µg/ml respectivamente. La curva de crecimiento que corresponde a la cepa MKW505 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15S130G}) crecida en ausencia de antibiótico que fue empleada como control positivo.

Solamente la cepa productora de la enzima CTX-M-15_{S130G} mostró un incremento en el número de viables después de una fuerte reducción poblacional, desde la hora 8 hasta alcanzar alta densidad poblacional (1.31×10^8). Por el contrario para la cepa MKW505 que expresa CTX-M-15 y OXA-1 y la cepa MH621 que expresa CTX-M-15, no se observó una selección de variantes más resistentes a la concentración de PTZ elegida y a las 24h no se recuperaron bacterias viables. Sin embargo, cuando la cepa MKW505 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15}+*bla*_{OXA-1}) fue

inoculada en LB líquido en presencia de PTZ a concentración de 32µg/ml (2x CMI inicial), se detectó un incremento a las 24 h de la densidad poblacional (**Figura 14**), pero éste fue inferior (3.8×10^3 ufc/ml) a la densidad poblacional inicial (1.00×10^5), y los valores de CMIs a PTZ de esos clones evolucionados no mostraron prácticamente diferencias con respecto a los valores originales (**tabla 12**).

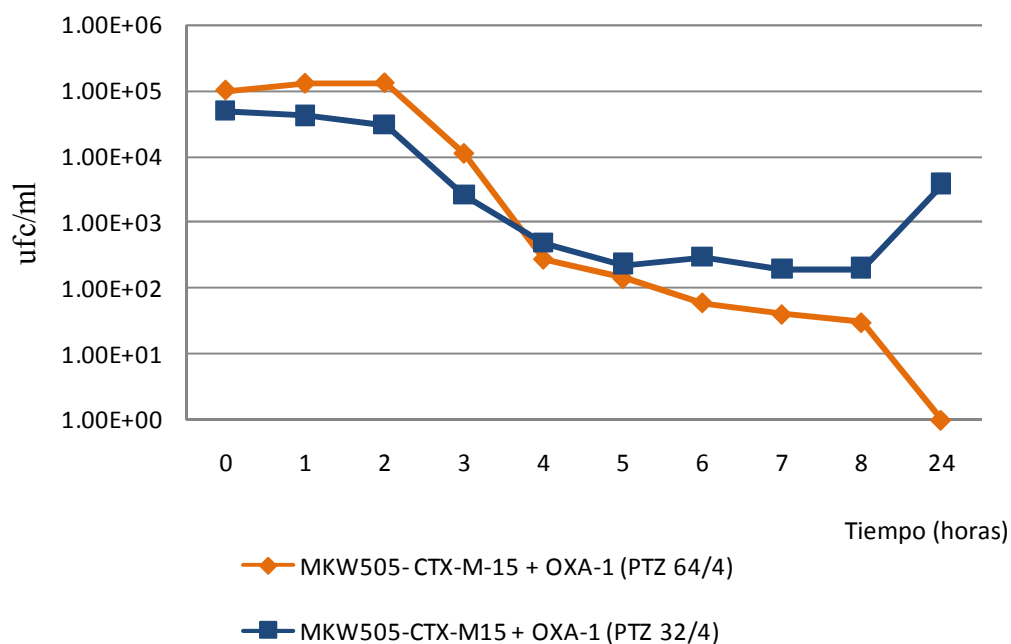


Figura 14. Curvas de muerte de la cepa de *E. coli* MKW505 portadora de las β -lactamasas CTX-M-15+OXA-1 en presencia de PTZ a concentraciones de 64/4 µg/ml (◆) y 32/4 µg/ml (■). Obsérvese como la densidad bacteriana final a 32/4 µg/ml es inferior a la concentración bacteriana de partida.

Los valores de CMIs frente a PTZ de la cepa MKW505 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15-S130G}) fueron más elevados en la población evolucionada que en la cepa original (CMI_{PTZ} a T₀) (**Tabla 12**), mientras que la cepa MKW505 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15}+*bla*_{OXA-1}) o no mostró incremento o fue residual (datos no mostrados). La FOX y CHL fueron empleados como marcadores de

impermeabilidad de membrana, únicamente viéndose pequeños incrementos en los valores de CMI de ambos antimicrobianos en el caso de MKW505 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15S130G}) evolucionada, pudiendo significar presuntivamente una alteración en OmpF (**Figura 13**).

La cepa MKW505 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15-S130G}) presenta alto nivel de resistencia (≥ 256 $\mu\text{g/ml}$) en prácticamente todos los clones probados, sin embargo la resistencia a FOX y CHL apenas se ve alterada, excepto en los clones evolucionados 1, 2 y 5 que duplican la CMI a CHL.

Cepas	Clones	Antibióticos ($\mu\text{g/ml}$)		
		PTZ	FOX	CHL
MKW505 (pBGS18- <i>bla</i> _{CTX-M15S130G})	Ancestral (CMI T₀)	32/48	4/4	6
	Evolucionado-1	≥ 256	6	12
	Evolucionado-2	≥ 256	6	12
	Evolucionado-3	≥ 256	6	8
	Evolucionado-4	≥ 256	6	8
	Evolucionado-5	≥ 256	6	12
	Evolucionado-6	≥ 256	6	6
	Evolucionado-7	≥ 256	6	6
	Evolucionado-8	≥ 256	4	4
	Evolucionado-9	≥ 256	6	6
	Evolucionado-10	192	4	8
MKW505 (pBGS18- <i>bla</i> _{CTX-M-15+} <i>bla</i> _{OXA-1})	Ancestral (CMI T₀)	16	6	8
	Evolucionado-1	12	3	4
	Evolucionado-2	16	3	4
	Evolucionado-3	24	2	4
	Evolucionado-4	24	2	4
MKW505		0.75	4	6

Tabla 12. Valores de CMIs ($\mu\text{g/ml}$) de las cepas MKW505 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15-S130G}), MKW505 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15+}*bla*_{OXA-1}) ancestrales y evolucionadas de los ensayos de curvas de muerte. La cepa MKW505 fue usada como cepa control. Obsérvese como los mutantes obtenidos a 32 $\mu\text{g/ml}$ de PTZ de la cepa que expresaba las dos β -lactamasas, CTX-M-15 y OXA-1, muestran también valores similares a la cepa isogénica ancestral a T₀. La concentración de tazobactam es siempre de 2 $\mu\text{g/ml}$.

Estabilidad del mecanismo de resistencia.

La obtención de variantes de la cepa de *E. coli* MKW505 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15-S130G}) con alto nivel de resistencia a PTZ (≥ 256 $\mu\text{g/ml}$) nos llevó a centrarnos exclusivamente en estos variantes. La primera premisa fue estudiar si estos variantes eran verdaderos mutantes con alto nivel de resistencia a PTZ. Para ello se aislaron dos clones crecidos a las 24 h en la curva de muerte en presencia de 96/4 $\mu\text{g/ml}$ de PTZ y se repitió el ensayo a la misma concentración. Como se observa en la **figura 15**, en esta ocasión los dos clones evolucionados de la cepa MKW505* (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15S130G})* (para diferenciarlo de la cepa original), mostraron una curva de crecimiento idéntica al control positivo, sugiriendo que se trata de mutantes verdaderos.

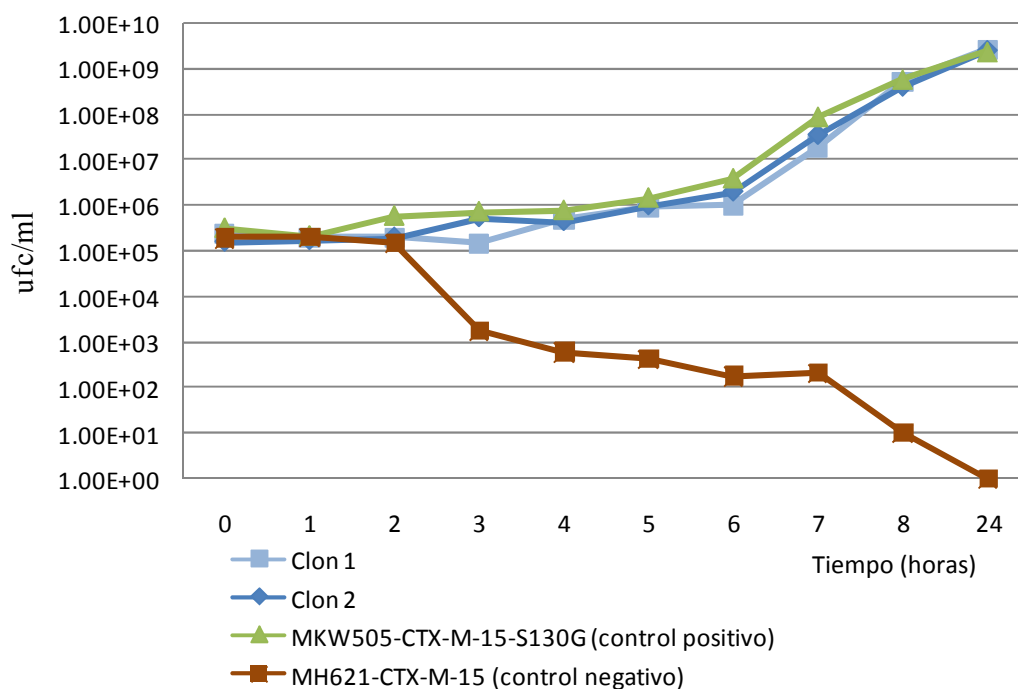


Figura 15- Curva de crecimiento en presencia de PTZ (96 $\mu\text{g/ml}$) de los clones 1 y 2 de la población evolucionada MKW505* (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15S130G})* (líneas azules). Las líneas verde y marrón corresponden a las curvas de crecimiento de las cepas de *E. coli* MKW505 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15S130G}) sin antibiótico y la cepa de *E. coli* MH621 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15}) en presencia de PTZ, que fueron empleadas como controles positivo y negativo, respectivamente.

La segunda premisa consistía en determinar si la mutación seleccionada en el experimento de curva de muerte era estable. Para ello se realizó un ensayo de pases seriados con 8 clones

(como se describe en Materiales y Métodos) solo en presencia de kan para garantizar que el plásmido no se perdiera (**Figura 11**). Los valores de CMI_{PTZ} con Etest y discos (**tabla 13**), mostraron que a partir de los 8 clones evolucionaron cuatro líneas evolutivas que mantuvieron, después de 3 días de crecimiento en ausencia de PTZ, el mismo nivel de resistencia (128-256 µg/ml) que la población evolucionada en el experimento de curva de muerte en presencia de PTZ. Por el contrario, 3 líneas evolutivas volvieron a mostrar valores de CMI idénticos a los de la cepa de *E.coli* MKW505 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15S130G}) inicial, es decir 48/4 µg/ml. En una de las líneas evolutivas (línea 4) se obtuvieron ambos tipos de cepas, tanto las que mantuvieron el fenotipo de resistencia estable (CMI_{PTZ}= 128-256 µg/ml) como las que restauraron el fenotipo inicial (CMI_{PTZ}= 48 µg/ml).

clones	curvas de muerte (T ₂₄)		Experimentos de estabilidad ^a	
	PTZ (µg/ml)	PTZ (mm)	PTZ (µg/ml)	PTZ (mm)
1	128-192	16	198-256	15
2	128	17	32	19
3	96-128	17	128	17
4	128-192	17	32/ 256	21/16
5	192	17	48/48	20/20
6	128	17	48	20
7	128	17	128-192	16 /19
8	64-96	18-19	128	18 /16
^b Cepa original (T0)	32-48	20		

Tabla 13. Valores de CMIs (µg/ml) de las cepas evolucionadas en los experimentos de estabilidad en presencia de Kan (50 µg/ml) comparados con los valores de CMIs de las cepas evolucionadas en los experimentos de curvas de muerte. ^aLos valores corresponden a las CMIs a PTZ después de 3 días de pases seriados (fuerte factor de dilución) en ausencia de PTZ. Los valores en negrita corresponden a mutantes estables que mantienen el nivel de resistencia. ^bCepa MKW505 sin plásmido. La concentración de tazobactam es siempre de 2 µg/ml.

Mientras se realizó este experimento para estimar la estabilidad del mutante con alto nivel de resistencia a PTZ, simultáneamente se fue realizando el recuento de viables como se muestra en la **figura 11** de Materiales y Métodos. La población sensible se infirió de la

diferencia de viables totales y del número de cepas crecidas en presencia de PTZ (96 µg/ml), y se calculó la proporción de cada población. En el día 0, la proporción (resistentes/sensibles) fue 1.67, mientras que a los dos días, la población resistente se hace minoritaria, alcanzando una proporción de 0.07, lo que permite sugerir que la cepa capaz de crecer en presencia de altas concentraciones de PTZ presenta alguna una mutación que supone un coste elevado en la capacidad replicativa, de tal manera que en ausencia de una fuerte presión selectiva, los mutantes con alto nivel de resistencia a PTZ, si se seleccionaran serían rápidamente desplazados por variantes con tasas más bajas de resistencia (ver apartado de *fitness* relativo más adelante).

Localización del mecanismo de resistencia.

Para valorar si el mecanismo de resistencia se encontraba en el plásmido, se extrajo el contenido plasmídico de 2 clones portadores de la enzima CTX-M-15_{S130G} y evolucionados en el experimento de cinética de muerte y se introdujo por transformación en *E. coli* MKW505 libre de plásmido [MKW505 (pBG18-CTX-M-15_{S130G})*] como se describe en la **figura 12**. Los valores de CMIs frente a PTZ, mostraron que el plásmido no era el responsable de la resistencia de los clones evolucionados. Por el contrario, para detectar si los cambios responsables del fenotipo de alta resistencia a PTZ ocurre por mutaciones en el cromosoma, en los genes de las porinas de membrana, que pudiesen alterar el nivel de expresión y por tanto disminuir la captación intracelular de la PTZ, se analizaron 4 clones de la cepa MKW505 evolucionada (MKW505*) que habían perdido el plásmido (segregación) como se describe en materiales y métodos. Las CMIs de 4 clones que segregaron el plásmido fueron estudiadas observándose un descenso en el valor de CMI_{PTZ} (0.75/4 µg/ml) y ningún cambio en las CMIs a FOX y CHL (**figura 16**).

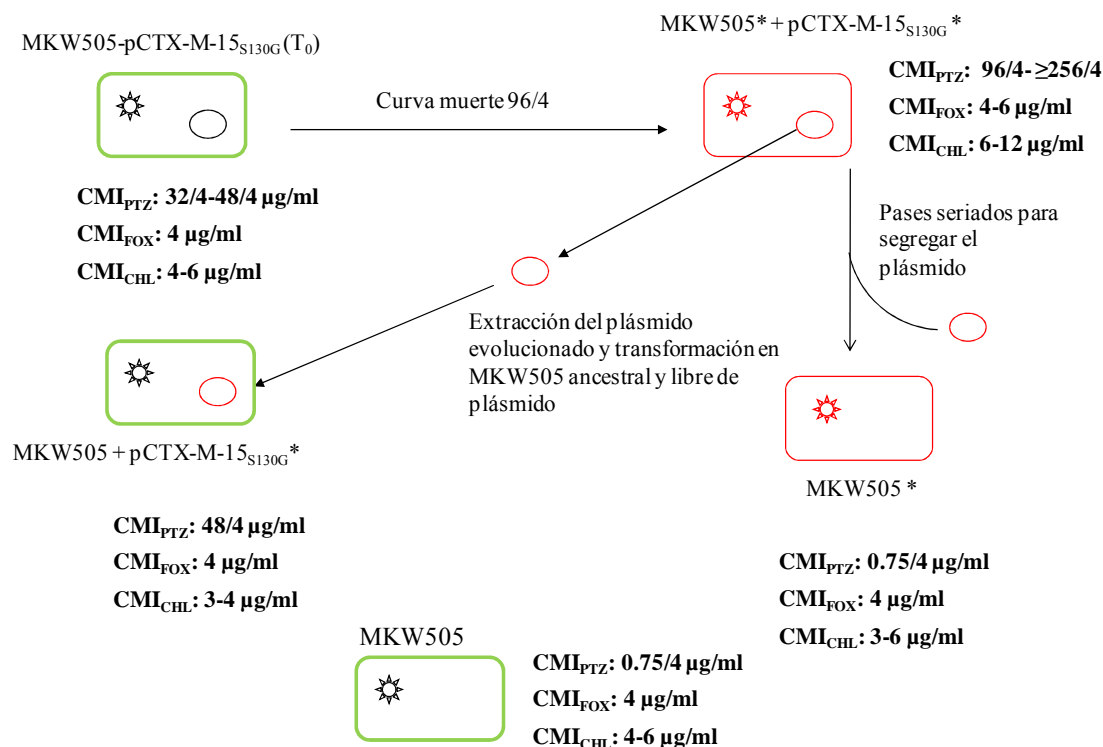


Figura 16. Valores de CMIs (µg/ml) de las cepas evolucionadas en los ensayos de curvas de muerte y de sus variantes obtenidas en los experimentos para averiguar dónde se encuentra el mecanismo de resistencia.

Fitness relativo de los clones evolucionados.

A la cepa de *E. coli* MKW505 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15-S130G}) ancestral se le adjudicó arbitrariamente un valor de fitness (*W*) de 1 atendiendo a su cinética de replicación. Las demás construcciones fueron comparadas respecto a este valor de *W*=1: MKW505* (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15-S130G})*, MKW505* que segregó el plásmido y MKW505 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15-S130G})*.

Como se muestra en la **Figura 17**, los 2 clones de MKW505* (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15-S130G})* evolucionados obtenidos en los experimentos de cinética de muerte en presencia de PTZ, mostraron un *W* negativo en comparación con las cepas ancestrales no evolucionadas (*W*=0.898/0.861). Este coste biológico desapareció cuando el plásmido evolucionado se introdujo en la cepa original libre de plásmido, MKW505 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15-S130G})*, (*W*=1.024/0.988) y se observó una ventaja o un incremento del *fitness* en los clones evolucionados que segregaron los plásmidos evolucionados, MKW505*(*W*=1.066/1.131).

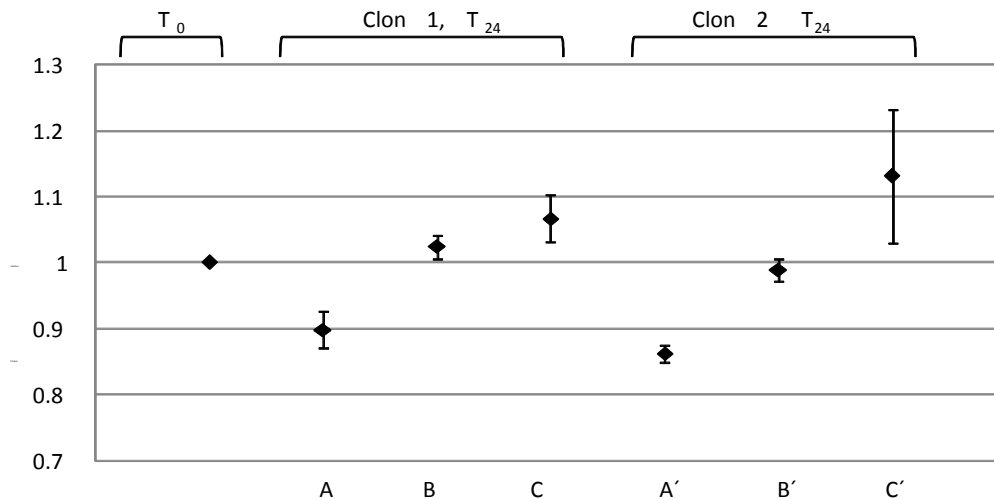


Figura 17. Fitness relativo (W) de los clones de *E.coli* MKW505 evolucionados portadores de la enzima CTX-M-15_{S130G} obtenidos en los experimentos de curvas de muerte. T_0 corresponde al valor W adjudicado arbitrariamente a la cepa ancestral MKW505 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15S130G}) antes del experimento de curva de muerte. A y A' muestran el valor de W de los 2 clones evolucionados MKW505* (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15S130G})* seleccionados durante el ensayo de cinética de muerte. B y B' muestran el valor de W respecto a T_0 de los 2 plásmidos (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15S130G})* evolucionados; C y C' muestran el valor de W de las cepas de *E. coli* MKW505* que segregaron los plásmidos.

El incremento de W que se observa en los 2 clones que segregaron el plásmido es coincidente con la idea que el plásmido pBGS18 confiere un coste biológico elevado (no estimado en esta Tesis), ya que hemos comprobado que en unos 3 días en ausencia de fuerza de selección, el plásmido es segregado (datos no mostrados). El mayor coste biológico se observa en los clones MKW505* (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15S130G})*, sugiriendo que la selección de alto nivel de resistencia a PTZ tiene, al menos en condiciones de laboratorio, un coste biológico alto que podría contribuir a que no se seleccionen en condiciones *in vivo*. Este resultado es coincidente con los resultados expuestos en el apartado de la estabilidad del mecanismo de resistencia, donde la población con alta resistencia es rápidamente desplazada por la población con menor nivel de resistencia a PTZ. Finalmente el resultado de comparar el valor de W de MKW505 (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15S130G})* y MKW505* (pBGS18-*bla*_{CTX-M-}

¹⁵S130G)* sugiere que la mutación pueda ocurrir en el ADN cromosómico pues cuando el plásmido (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15S130G})* se transforma en una cepa de *E.coli* MKW505 no evolucionada se restituye el fitness.

PCRs de los genes de las porinas *ompF*, *ompC* y de sus genes reguladores *envZ* y *ompR*.

E.coli tiene un sistema de dos componentes que tienen un importante papel en la regulación de la respuesta celular en la osmoregulación. EnvZ es el sensor que una vez activado induce la fosforilación en el regulador OmpR. Los niveles de OmpR-fosforilados condiciona los niveles de OmpF y OmpC al unirse a las secuencias promotoras de ambos genes. Es conocido que con una frecuencia de 10^{-3} - 10^{-2} se seleccionan en condiciones de laboratorio variantes con pérdida o bajo nivel de expresión de porinas OmpF y/o OmpC que disminuye la permeabilidad de solutos al interior de la célula (en el curso de esta Tesis se comprobó también la frecuencia de aparición de estos mutantes que osciló entre $1,6 \times 10^{-2}$ hasta $6,4 \times 10^{-3}$). Los 12 clones analizados durante el curso de esta Tesis [MKW505* (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15-S130G})* y MKW505* (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15+OXA-1})* con niveles de resistencia altos y residuales a PTZ, respectivamente] no presentaron cambios en los genes *envZ*, *ompR*, *ompC* ni *ompF*. Adicionalmente los genes *bla*_{CTX-M} y las regiones promotoras *lacZ* del plásmido pBGS18 de los clones evolucionados fueron secuenciadas, pero igualmente, no se detectó ningún cambio. Por lo que al finalizar esta Tesis no hemos podido concluir cual es el mecanismo responsable de la alta resistencia a PTZ, pero que parecen ser distintos a los previamente descritos que afectan a las proteínas de membrana.

Discusión

Tres cepas de *E. coli* con diferente nivel de resistencia a PTZ (entre 1-48 µg/ml) debido a diferentes mecanismos de resistencia (producción de CTX-M-15 en combinación con la pérdida de la porina ompF; presencia simultánea de CTX-M-15 mas OXA-1; presencia de CTX-M-15_{S130G}) fueron expuestas en estudios de cinética de muerte a diferentes concentraciones de PTZ (entre 16-96 µg/ml respectivamente), correspondiendo a valores de 2-, 4x la CMI o la concentración umbral de resistencia a PTZ según los criterios de EUCAST. Solamente las cepas con valores iniciales de CMI >16 µg/ml seleccionaron variantes con alto nivel de resistencia a PTZ. Este resultado sugiere que el fracaso terapéutico en tratamientos con PTZ requeriría la presencia previa en la población bacteriana de variantes con sensibilidad disminuida. Sin embargo, en nuestro modelo experimental, la selección de esas variantes ocurría a partir de las 8 h de exposición al β-lactámico, cuando el tratamiento convencional con PTZ (4/0,5g) es cada 6h ^(9,139,173), por lo tanto la selección de variantes resistentes no sería fácil.

En el modelo *in vivo*, se produce la eliminación urinaria de PTZ (por vía renal fundamentalmente) que no se contempla en nuestro modelo experimental. La vida media de la PTZ, en voluntarios sanos es 1,70h ⁽³²⁾, mientras que en pacientes con infección sistémica aumenta hasta 2,58 h ⁽²⁴³⁾. Estos datos farmacocinéticos son importantes en los estudios sobre la eficacia bactericida de los antibióticos β-lactámicos, ya que la actividad bactericida es tiempo-dependiente (a diferencia de otros antibióticos como aminoglucósidos o las fluorquinolonas); es decir, el efecto bactericida es dependiente del tiempo que la concentración de antibiótico libre permanece por encima de la CMI ⁽²⁴⁴⁾. Estudios de modelización matemática según la simulación Monte Carlo, sugieren que para mantener la concentración plasmática del β-lactámico por encima de la CMI entre el 90-100% del tiempo entre los intervalos de las dosis (6h), la concentración de antibiótico administrada debe ser 4 veces la CMI ⁽²⁴⁴⁾.

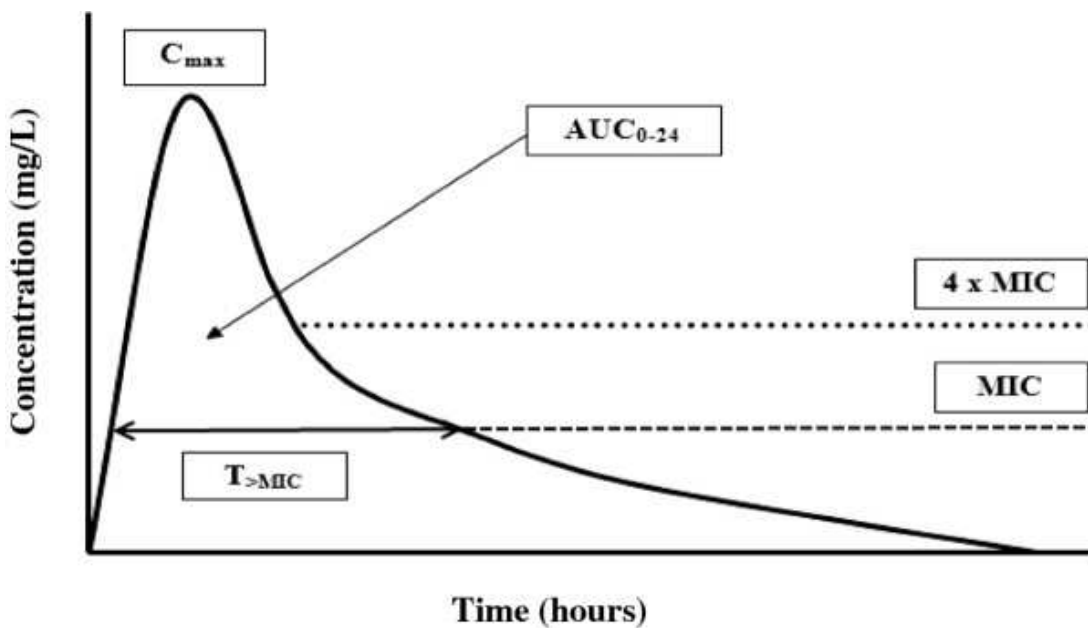


Figura 18. Curva de parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos de los antibióticos, donde se enfrentan la concentración y el tiempo. $T_{>MIC}$, es el tiempo durante el cual la concentración del antibiótico libre permanece por encima de la CMI en un periodo correspondiente a una dosis; C_{max} , es la concentración máxima de antibiótico en sangre; AUC_{0-24} , es el área bajo la curva (*area under the concentration-time curve*) durante un periodo de tiempo de 24 h.

La obtención de variantes resistentes es más fácil cuando las poblaciones bacterianas se exponen a concentraciones de 2 veces el valor de la CMI, hecho que confirman los datos inferidos de las simulaciones de Monte Carlo y de ensayos clínicos ⁽²⁹⁾. De manera que si existen circunstancias biológicas que influyen en la farmacocinética (enfermedad severa, obesidad mórbida, inmunosupresión, etc) y que generen una eliminación más rápida de PTZ, el efecto bactericida no sería óptimo y la probabilidad de seleccionar variantes resistentes sería mayor y también la probabilidad de fracaso terapéutico.

Estudios sobre voluntarios sanos, sugieren que el régimen convencional de 4/05g de PTZ cada 6 h tiene una probabilidad $\geq 95\%$ de erradicar el agente patógeno (entendido como el % del tiempo que la concentración del antibiótico libre es superior al valor de la CMI) cuando los valores de CMI_{PTZ} son $\leq 8 \mu\text{g/ml}$, pero si son $\leq 16 \mu\text{g/ml}$, el intervalo debería reducirse a 4h. ^(139,230). Sin embargo, en individuos con infecciones por *E.coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE (>90% y 60% de los aislados no son resistentes a PTZ, según criterios de EUCAST),

el tratamiento convencional (cada 6h) mostró un porcentaje de erradicación del 30% que ascendió hasta el 77% si el intervalo de dosis se reducía a 4h ⁽⁹⁾. Por otra parte, en individuos severamente enfermos, la dosis convencional resulta claramente insuficiente. En esos pacientes solamente cuando la CMI_{PTZ} del agente patógeno fue $\leq 2\mu\text{g/ml}$, se alcanzaron unos porcentajes de erradicación similares a los descritos en voluntarios sanos y, para valores CMI_{PTZ} $\leq 16\mu\text{g/ml}$ la probabilidad de erradicación fue del 44% ^(229,243), por lo que en este escenario (grupo de pacientes donde el consumo de PTZ es alto) la posibilidad de seleccionar variantes más resistentes que induzcan fracaso terapéutico es elevado. Diferentes ensayos clínicos se están realizando actualmente acortando el tiempo de administración de PTZ o incluso la administración continua ^(2,82), pero este punto es aun objeto de debate.

Por lo tanto conforme a nuestros datos experimentales y los datos farmacocinéticos (al menos en pacientes con enfermedad severa) y los regímenes antibióticos convencionales, la presencia de mecanismos de bajo o medio nivel de resistencia puede acabar seleccionando variantes con alta resistencia que induzcan fracaso terapéutico si se dan una serie de circunstancias: que la administración sea cada $\geq 8\text{h}$ (algunos regímenes así lo sugerían), que debido a la existencia de patologías, la concentración de antibiótico libre sea inferior a 4 veces la CMI. Sin embargo no se detectan esas variantes, ¿por qué?.

En los experimentos de cinética de muerte, podemos ver que la cepa portadora de la β -lactamasa CTX-M-15_{S130G}, muestra un re-crecimiento a las 8 h que alcanza una densidad bacteriana de 1.31×10^8 ufc/ml a las 24h. Las variantes recuperadas mostraron un incremento de la CMI_{PTZ} de $48 \mu\text{g/ml}$ hasta $\geq 256 \mu\text{g/ml}$. Cuando desaparece la presión selectiva (presencia de PTZ) solo la mitad de los clones recuperados mantenían altos niveles de resistencia (experimentos para estudiar la estabilidad del mecanismo de resistencia). Los recuentos en días seriados revelaron que la proporción entre población resistente/sensible cambió de 1.67 a 0.07, sugiriendo que o bien la señal que induce la respuesta fenotípica desaparece rápidamente después de eliminar la fuerza de selección (posible incremento en el nivel de expresión de AmpC cromosómica) o que la adquisición de la resistencia de alto nivel tiene un coste biológico alto para la bacteria. Esta última premisa se confirma en los estudios de curvas de crecimiento en medio LB de clones MKW505* (pBGS18-*bla*_{CTX-M-15S130G})*, en los que los clones evolucionados muestran un coste biológico (entre el 10% y el 14%), explicando el

hecho de que la población resistente se vaya haciendo minoritaria si no hay presión selectiva (en los experimentos de estabilidad del mecanismo de resistencia), y por ello, además indica que estas cepas no persistirían durante períodos de tiempo largos en la población bacteriana en ausencia de selección antibiótica ^(10,11).

El coste biológico podría dificultar la persistencia de estas variantes, sin embargo hay estudios que sugieren que si la presión de selección es mantenida en el tiempo (individuos de UCI con largos períodos de tratamiento), la aparición de mutaciones compensatorias que restauren el déficit en la capacidad replicativa de la cepa resistente es casi siempre seguro, de manera que serían altamente estables y difíciles de erradicar.

En el caso cepa portadora de CTX-M-15 más OXA-1, aunque se puede observar un recrecimiento en el tiempo final sólo en presencia de 32 µg/ml de TZP (2 veces la CMI), la densidad bacteriana es menor (3.8×10^3 ufc/ml) que en el caso anterior. Los valores de CMIs a TZP de esos clones evolucionados no mostraron diferencias con respecto a los valores originales. Este resultado podría deberse a la formación de bacterias persistentes durante el experimento ⁽¹¹⁹⁾.

En el ensayo experimental presentado en este capítulo las bacterias fueron expuestas a un único ciclo de crecimiento en presencia de PTZ, los sucesivos ciclos de crecimiento en concentraciones crecientes podrían seleccionar la aparición de mutaciones compensatorias.

Finalmente, en estudios con diseño experimental similar al propuesto en esta parte de la Tesis pero en presencia de ertapenem ⁽²⁴⁵⁾ se obtuvieron resultados similares. En esos casos, se encontraron mutaciones en el gen *ompR* en las 5 poblaciones evolucionadas que mostraron incremento en las CMIs a ertapenem, pero no se encontraron mutaciones en los genes de las porinas *ompF*, *ompC*. En otro estudio del mismo grupo ⁽³⁾, clones evolucionados en presencia de meropenem mostraron mutaciones en los 4 genes (*ompR*, *envZ*, *ompF* y *ompC*), pero en el caso de los clones seleccionados con ertapenem, muchos de ellos no tuvieron cambios en estos genes, aunque mostraron una menor o nula expresión de OmpF, indicando que la resistencia se debe a otros genes reguladores de la expresión de las porinas.

En nuestro caso, ninguno de los clones portadores de los genes *bla*_{CTX-M-15S130G} ni *bla*_{CTX-M-15+OXA-1}, presentaron cambios en el gen *bla*_{CTX-M}, ni en el promotor *lacZ* del vector pBGS18 [los genes *bla* se clonaron sin sus promotores naturales, hecho que descarta un aumento en el

número de copias de cada gen, lo que ha sido descrito recientemente ⁽³⁾. Tampoco en los genes de las porinas de membrana (*ompF*, *ompC*) ni en los principales genes que regulan su expresión (*envZ*, *ompR*). Esto sugiere que otros genes del cromosoma bacteriano diferentes de los estudiados aquí, podrían estar implicados en el fenotipo de resistencia mostrado por los clones evolucionados ^(75,86,175).

En conclusión, si bien este trabajo tiene algunas limitaciones, podemos concluir que biológicamente es posible la selección de variantes CTX-M con alto nivel de resistencia a la combinación BLiBL, pero que existen algunas restricciones farmacocinéticas y/o constricciones biológicas (defectos en *fitness*) y haría falta que existiera algún mecanismo previo de sensibilidad disminuida a estas combinaciones para que finalmente estos variantes puedan ser seleccionados y detectados en la práctica clínica.

CONCLUSIONES GENERALES

1.- Los resultados de los estudios *in vitro* realizados en el capítulo 1 de esta Tesis demuestran que todos los linajes estudiados de las β -lactamasas de espectro extendido de tipo CTX-M tienen posibilidad de adquirir mutaciones que confieren un fenotipo de resistencia o una sensibilidad disminuida a la combinación de un β -lactámico más un inhibidor de β -lactamasa (BLiBL).

2.- Tres tipos de mutaciones en beta-lactamasas CTX-M estuvieron implicadas en el fenotipo de resistencia o sensibilidad disminuida a la combinación BLiBL: el cambio S130G confirió la mayor resistencia, seguido del cambio K234R y S237G.

3.- Se observó una relación inversa entre la eficiencia hidrolítica frente a la combinación BLiBL y la resistencia a oximino-cefalosporinas como cefotaxima y ceftazidima. Este fenómeno se conoce como antagonismo pleiotrópico.

4.- La mutación L169S es una mutación compensatoria que restaura la pérdida de actividad enzimática frente a oximino-cefalosporinas en mutantes CTX-M con una mutación previa que confiere resistencia a inhibidores.

5.- La mayoría de los laboratorios de Microbiología clínica que participaron en el estudio del Control de Calidad realizado a través de la SEIMC, identificaron el mecanismo de resistencia mostrado por los variantes *IR*-CTX-M (variantes S130G) como producción de penicilinas resistente a BLiBLs (mayoritariamente como IRTs) e identificaron a los variantes *CM*-CTX-M (mutantes S237G y K234R) como productores de BLEE sensibles a BLiBLs, nunca sospechando de un fenotipo *complex mutant*.

6.- A pesar de observarse resistencia a los BLiBLs, la mayoría de los centros no lo tienen en cuenta a la hora de determinar el mecanismo de resistencia y no lo informan (independientemente de la CMI), por lo que podría desencadenar en un fallo terapéutico si se tratara con BLiBL. Por el contrario, en los casos en los que hay sensibilidad frente a BLiBLs, algunos centros no lo recomendaron como tratamiento, a pesar de que existen evidencias que sugieren el efecto positivo del tratamiento con estos compuestos.

7.- Un 38.1% de todos los errores, que afectaron al 80% de los laboratorios participantes, se debió a cambios manuales introducidos cuando los microbiólogos inferieron el mecanismo de resistencia, aunque las recomendaciones recientes de EUCAST y CLSI sugieren no realizar lectura interpretada del antibiograma.

8.- Entre las tres cepas de *Escherichia coli* con diferentes niveles de resistencia a piperacilina-tazobactam, tan solo en el caso de la cepa portadora de CTX-M-15_{S130G} con un valor de CMI>16 µg/ml, se encontraron variantes con alto nivel de resistencia, lo que sugiere que el fracaso terapéutico en tratamientos con piperacilina-tazobactam probablemente requiere la presencia previa de una subpoblación bacteriana con sensibilidad disminuida.

9.- Las variantes de CTX-M-15_{S130G} con alto nivel de resistencia a piperacilina-tazobactam poseen un coste biológico entre 10-14%, explicando el hecho de que la población con alta resistencia sea aclarada si no hay presión selectiva. Además la selección de mutantes surgiría a partir de las 6h de exposición al antibiótico, lo que dificultaría su selección si se administra el antibiótico de la manera convencional.

10.- No es esperable que las cepas que expresan simultáneamente CTX-M-15 y OXA-1, muy prevalente en la actualidad, sean capaces de dar lugar a variantes con alto nivel de resistencia a BLiBLs, lo que disminuye el riesgo de aparición en la clínica de resistencias derivadas de este doble mecanismo de resistencia.

11.- Difícilmente se seleccionarán en la clínica variantes CTX-M resistentes a la combinación de un BLiBL porque existen restricciones enzimáticas como el antagonismo pleiotrópico. La emergencia de dichos variantes parece requerir la pre-existencia de una subpoblación con sensibilidad disminuida; además, existe un coste biológico que hará que, en ausencia de tratamiento, las variantes con alta resistencia sean desplazadas por variantes menos resistentes. Para que estos obstáculos se superen deberían acumularse secuencialmente varias mutaciones en diferentes localizaciones del genoma bacteriano.

BIBLIOGRAFÍA

1. 2013. The antibiotic alarm. *Nature*. 495:141-
2. Abdul-Aziz MH, Dulhunty JM, Bellomo R, Lipman J, Roberts JA. 2012. Continuous beta-lactam infusion in critically ill patients: the clinical evidence. *Ann Intensive Care*. 2:37-
3. Adler M, Anjum M, Andersson DI, Sandegren L. 2013. Influence of acquired beta-lactamases on the evolution of spontaneous carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 68:51-59.
4. Agerso Y, Aarestrup FM, Pedersen K, Seyfarth AM, Struve T, Hasman H. 2012. Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing *Escherichia coli* in Danish slaughter pigs and retail meat identified by selective enrichment and association with cephalosporin usage. *J Antimicrob Chemother*. 67:582-588.
5. Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol*. 8:251-259.
6. Alonso-Echanove J, Robles B, Jarvis WR. 1999. Proficiency of clinical laboratories in Spain in detecting vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. The Spanish VRE Study Group. *J Clin Microbiol*. 37:2148-2152.
7. Ambler RP. 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 289:321-331.
8. Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, Levesque RC, Tiraby G, Waley SG. 1991. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J*. 276 (Pt 1):269-270.
9. Ambrose PG, Bhavnani SM, Jones RN. 2003. Pharmacokinetics-pharmacodynamics of cefepime and piperacillin-tazobactam against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum beta-lactamases: report from the ARREST program. *Antimicrob Agents Chemother*. 47:1643-1646.
10. Andersson DI and Hughes D. 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol*. 8:260-271.
11. Andersson DI and Levin BR. 1999. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol*. 2:489-493.
12. Arias C and Murray B. 2013. Antibiotic-Resistant Bugs in the 21st Century, A Clinical Super-Challenge. *The New England Journal of Medicine*. 360:439-443.
13. Aumeran C, Chanal C, Labia R, Sirot D, Sirot J, Bonnet R. 2003. Effects of Ser130Gly and Asp240Lys substitutions in extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-9. *Antimicrob Agents Chemother*. 47:2958-2961.
14. Bae IK, Lee BH, Hwang HY, Jeong SH, Hong SG, Chang CL, Kwak HS, Kim HJ, Youn H. 2006. A novel ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase, CTX-M-54, with a single amino acid substitution at position 167 in the omega loop. *J Antimicrob Chemother*. 58:315-319.
15. Bae IK, Lee YN, Jeong SH, Hong SG, Lee JH, Lee SH, Kim HJ, Youn H. 2007. Genetic and biochemical characterization of

GES-5, an extended-spectrum class A beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 58:465-468.

16. Baquero F. 2004. From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol*. 2:510-518.

17. Baquero F. 2011. The 2010 Garrod Lecture: the dimensions of evolution in antibiotic resistance: ex unibus plurum et ex pluribus unum. *J Antimicrob Chemother*. 66:1659-1672.

18. Baquero F, Coque TM, de la CF. 2011. Ecology and evolution as targets: the need for novel eco-evo drugs and strategies to fight antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 55:3649-3660.

19. Baquero F, Negri MC, Morosini MI, Blazquez J. 1998. Antibiotic-selective environments. *Clin Infect Dis*. 27 Suppl 1:S5-11.

20. Barlow M and Hall BG. 2002. Predicting evolutionary potential: in vitro evolution accurately reproduces natural evolution of the tem beta-lactamase. *Genetics*. 160:823-832.

21. Barlow M, Reik RA, Jacobs SD, Medina M, Meyer MP, McGowan JE, Jr., Tenover FC. 2008. High rate of mobilization for blaCTX-Ms. *Emerg Infect Dis*. 14:423-428.

22. Barthelemy M, Peduzzi J, Bernard H, Tancrede C, Labia R. 1992. Close amino acid sequence relationship between the new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase MEN-1 and chromosomally encoded enzymes of *Klebsiella oxytoca*. *Biochim Biophys Acta*. 1122:15-22.

23. Bauernfeind A, Casellas JM, Goldberg M, Holley M, Jungwirth R, Mangold P, Rohnisch T, Schweighart S, Wilhelm R. 1992. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection*. 20:158-163.

24. Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. 1990. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*. 18:294-298.

25. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Ernst S, Casellas JM. 1996. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 40:509-513.

26. Bermudes H, Jude F, Chaibi EB, Arpin C, Bebear C, Labia R, Quentin C. 1999. Molecular characterization of TEM-59 (IRT-17), a novel inhibitor-resistant TEM-derived beta-lactamase in a clinical isolate of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob Agents Chemother*. 43:1657-1661.

27. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, Barton HA, Wright GD. 2012. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One*. 7:e34953-

28. Blazquez J, Morosini MI, Negri MC, Baquero F. 2000. Selection of naturally occurring extended-spectrum TEM beta-lactamase variants by fluctuating beta-lactam pressure. *Antimicrob Agents Chemother*. 44:2182-2184.

29. Blondiaux N, Wallet F, Favory R, Onimus T, Nseir S, Courcol RJ, Durocher A, Roussel-Delvallez M. 2010. Daily serum piperacillin monitoring is advisable in critically ill patients. *Int J Antimicrob Agents*. 35:500-503.

30. Bonnet R, Dutour C, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, Labia R, De CC, Sirot J. 2001. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-->Gly. *Antimicrob Agents Chemother*. 45:2269-2275.

31. Bonnet R, Sampaio JL, Labia R, De CC, Sirot D, Chanal C, Sirot J. 2000. A

- p novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil.
- Antimicrob Agents Chemother.*
- 44:1936-1942.
32. Bourget P, Lesne-Hulin A, Le RR, Le BH, Carsin H. 1996. Clinical pharmacokinetics of piperacillin-tazobactam combination in patients with major burns and signs of infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 40:139-145.
 33. Boyd DA, Tyler S, Christianson S, McGeer A, Muller MP, Willey BM, Bryce E, Gardam M, Nordmann P, Mulvey MR. 2004. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:3758-3764.
 34. Bradford PA. 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 14:933-51, table.
 35. Brinas L, Moreno MA, Teshager T, Saenz Y, Porrero MC, Dominguez L, Torres C. 2005. Monitoring and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:1262-1264.
 36. Bush K. 2010. Alarming beta-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Curr Opin Microbiol.* 13:558-564.
 37. Bush K, Courvalin P, Dantas G, Davies J, Eisenstein B, Huovinen P, Jacoby GA, Kishony R, Kreiswirth BN, Kutter E, Lerner SA, Levy S, Lewis K, Lomovskaya O, Miller JH, Mobashery S, Piddock LJ, Projan S, Thomas CM, Tomasz A, Tulkens PM, Walsh TR, Watson JD, Witkowski J, Witte W, Wright G, Yeh P, Zgurskaya HI. 2011. Tackling antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 9:894-896.
 38. Bush K and Fisher JF. 2011. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new beta-lactamases from gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 65:455-478.
 39. Bush K and Jacoby GA. 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:969-976.
 40. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 39:1211-1233.
 41. Camps M, Herman A, Loh E, Loeb LA. 2007. Genetic constraints on protein evolution. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 42:313-326.
 42. Cantón R, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Miriagou V, Naas T, Rossolini GM, Samuelsen O, Seifert H, Woodford N, Nordmann P. 2012. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 18:413-431.
 43. Cantón R and Coque TM. 2006. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 9:466-475.
 44. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. 2012. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol.* 3:110-
 45. Cantón R, Loza E, Del Carmen CM, Baquero F, Martínez-Martínez L. 2003. Quality control for beta-lactam susceptibility testing with a well-defined collection of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* strains in Spain. *J Clin Microbiol.* 41:1912-1918.
 46. Cantón R and Morosini MI. 2011. Emergence and spread of antibiotic

resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol Rev.* 35:977-991.

47. Cantón R, Morosini MI, de la Maza OM, de la Pedrosa EG. 2008. IRT and CMT beta-lactamases and inhibitor resistance. *Clin Microbiol Infect.* 14 Suppl 1:53-62.

48. Cantón R, Oliver A, Coque TM, Varela MC, Perez-Díaz JC, Baquero F. 2002. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J Clin Microbiol.* 40:1237-1243.

49. Carattoli A, Lovari S, Franco A, Cordaro G, Di MP, Battisti A. 2005. Extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:833-835.

50. Cartelle M, del Mar TM, Molina F, Moure R, Villanueva R, Bou G. 2004. High-level resistance to ceftazidime conferred by a novel enzyme, CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240-Gly substitution. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:2308-2313.

51. Centers for Disease Control and Prevention. 2010. Detection of *Enterobacteriaceae* isolates carrying metallo-beta-lactamase - United States, 2010. 59:750-750.

52. Chaitram JM, Jevitt LA, Lary S, Tenover FC. 2003. The World Health Organization's External Quality Assurance System Proficiency Testing Program has improved the accuracy of antimicrobial susceptibility testing and reporting among participating laboratories using NCCLS methods. *J Clin Microbiol.* 41:2372-2377.

53. Chen S, Hu F, Xu X, Liu Y, Wu W, Zhu D, Wang H. 2011. High prevalence of KPC-2-type carbapenemase coupled with CTX-M-type extended-spectrum beta-

lactamases in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:2493-2494.

54. Clark RLMLMTR. 2009. Verification and Validation of Procedures in the Clinical Microbiology Laboratory. Coordinating ed. Sharp SE. ASM Press, Washington, DC.

55. Clinical and Laboratory Standard Institute. 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, 8th edn. Document M07-A9. Wayne, PA. CLSI 2012.

56. Clinical and Laboratory Standard Institute. 2013. Performance and Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty third International Supplement. Document M-100-S23. Wayne, PA, CLSI 2013.

57. Clinical and Laboratory Standard Institute. 2013. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved Standard, 8th edn. Document M02-A11. Wayne, PA, CLSI 2012.

58. Condon C and Weiner JH. 1988. Fumarate reductase of *Escherichia coli*: an investigation of function and assembly using in vivo complementation. *Mol Microbiol.* 2:43-52.

59. Conejo MC, Mata C, Navarro F, Pascual A. 2008. Detection and reporting beta-lactam resistance phenotypes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: a multicenter proficiency study in Spain. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 62:317-325.

60. Coque TM, Baquero F, Canton R. 2008. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveill.* 13:

61. Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, Baquero F, Canton R, Nordmann P. 2008.

- Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis.* 14:195-200.
62. Coque TM, Oliver A, Perez-Díaz JC, Baquero F, Cantón R. 2002. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother.* 46:500-510.
63. Correia M, Boavida F, Grosso F, Salgado MJ, Lito LM, Cristino JM, Mendo S, Duarte A. 2003. Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:2838-2843.
64. Costa D, Poeta P, Saenz Y, Vinue L, Rojo-Bezares B, Jouini A, Zarazaga M, Rodrigues J, Torres C. 2006. Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *J Antimicrob Chemother.* 58:1311-1312.
65. Cullik A, Pfeifer Y, Prager R, von BH, Witte W. 2010. A novel IS26 structure surrounds blaCTX-M genes in different plasmids from German clinical *Escherichia coli* isolates. *J Med Microbiol.* 59:580-587.
66. Curiao T, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, Robustillo A, Baquero F, Coque TM, Canton R. 2010. Emergence of bla KPC-3-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 65:1608-1614.
67. Cuzon G, Ouanich J, Gondret R, Naas T, Nordmann P. 2011. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:2420-2423.
68. D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. 2013. CTX-M-type beta-lactamases: A successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol.*
69. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN, Wright GD. 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature.* 477:457-461.
70. D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. 2006. Sampling the antibiotic resistome. *Science.* 311:374-377.
71. Dagert M and Ehrlich SD. 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene.* 6:23-28.
72. Danishuddin M and Khan AU. 2011. Molecular modeling and docking analysis of beta-lactamases with inhibitors: a comparative study. *In Silico Biol.* 11:273-280.
73. Davies J. 2007. Microbes have the last word. A drastic re-evaluation of antimicrobial treatment is needed to overcome the threat of antibiotic-resistant bacteria. *EMBO Rep.* 8:616-621.
74. Davies J and Davies D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 74:417-433.
75. De la Cruz MA and Calva E. 2010. The complexities of porin genetic regulation. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 18:24-36.
76. Delmas J, Robin F, Carvalho F, Mongaret C, Bonnet R. 2006. Prediction of the evolution of ceftazidime resistance in extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-9. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:731-738.
77. Diaz MA, Hernandez-Bello JR, Rodriguez-Bano J, Martinez-Martinez L, Calvo J, Blanco J, Pascual A. 2010. Diversity of *Escherichia coli* strains

producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: second nationwide study. *J Clin Microbiol.* 48:2840-2845.

78. Djamdjian L, Naas T, Tande D, Cuzon G, Hanrotel-Saliou C, Nordmann P. 2011. CTX-M-93, a CTX-M variant lacking penicillin hydrolytic activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:1861-1866.

79. Docobo-Perez F, Lopez-Cerero L, Lopez-Rojas R, Egea P, Dominguez-Herrera J, Rodriguez-Bano J, Pascual A, Pachon J. 2013. Inoculum Effect on the Efficacies of Amoxicillin-Clavulanate, Piperacillin-Tazobactam, and Imipenem against Extended-Spectrum beta-Lactamase (ESBL)-Producing and Non-ESBL-Producing *Escherichia coli* in an Experimental Murine Sepsis Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:2109-2113.

80. Doumith M, Dhanji H, Ellington MJ, Hawkey P, Woodford N. 2012. Characterization of plasmids encoding extended-spectrum beta-lactamases and their addiction systems circulating among *Escherichia coli* clinical isolates in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 67:878-885.

81. Dubois V, Poirel L, Demarthe F, Arpin C, Coulangue L, Minarini LA, Bezian MC, Nordmann P, Quentin C. 2008. Molecular and biochemical characterization of SHV-56, a novel inhibitor-resistant beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:3792-3794.

82. Dulhunty JM, Roberts JA, Davis JS, Webb SA, Bellomo R, Gomersall C, Shirwadkar C, Eastwood GM, Myburgh J, Paterson DL, Lipman J. 2013. Continuous infusion of beta-lactam antibiotics in severe sepsis: a multicenter double-blind, randomized controlled trial. *Clin Infect Dis.* 56:236-244.

83. Dumartin C, Rogues AM, Amadeo B, Pefau M, Venier AG, Parneix P, Maurain

C. 2011. Antibiotic usage in south-western French hospitals: trends and association with antibiotic stewardship measures. *J Antimicrob Chemother.* 66:1631-1637.

84. Ellington MJ, Livermore DM, Pitt TL, Hall LM, Woodford N. 2006. Development of extended-spectrum activity in TEM beta-lactamases in hyper-mutable, *mutS* *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect.* 12:800-803.

85. Faheem M, Rehman MT, Danishuddin M, Khan AU. 2013. Biochemical Characterization of CTX-M-15 from *Enterobacter cloacae* and Designing a Novel Non-beta-Lactam-beta-Lactamase Inhibitor. *PLoS One.* 8:e56926-

86. Fajardo A, Martinez-Martin N, Mercadillo M, Galan JC, Ghysels B, Matthijs S, Cornelis P, Wiehlmann L, Tummler B, Baquero F, Martinez JL. 2008. The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS One.* 3:e1619-

87. Falagas ME, Kastoris AC, Kapaskelis AM, Karageorgopoulos DE. 2010. Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum beta-lactamase producing, Enterobacteriaceae infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 10:43-50.

88. Ferrario M, Ernsting BR, Borst DW, Wiese DE, Blumenthal RM, Matthews RG. 1995. The leucine-responsive regulatory protein of *Escherichia coli* negatively regulates transcription of *ompC* and *micF* and positively regulates translation of *ompF*. *J Bacteriol.* 177:103-113.

89. Ford PJ and Avison MB. 2004. Evolutionary mapping of the SHV beta-lactamase and evidence for two separate IS26-dependent *blaSHV* mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome. *J Antimicrob Chemother.* 54:69-75.

90. Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM, Sommer MO, Dantas G. 2012. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*. 337:1107-1111.
91. Fournier D, Chirouze C, Leroy J, Cholley P, Talon D, Plesiat P, Bertrand X. 2013. Alternatives to carbapenems in ESBL-producing *Escherichia coli* infections. *Med Mal Infect*. 43:62-66.
92. Galan JC, Gonzalez-Candelas F, Rolain JM, Canton R. 2013. Antibiotics as selectors and accelerators of diversity in the mechanisms of resistance: from the resistome to genetic plasticity in the beta-lactamases world. *Front Microbiol*. 4:9-
93. Galan JC, Morosini MI, Baquero MR, Reig M, Baquero F. 2003. Haemophilus influenzae bla(ROB-1) mutations in hypermutagenic deltaampC *Escherichia coli* conferring resistance to cefotaxime and beta-lactamase inhibitors and increased susceptibility to cefaclor. *Antimicrob Agents Chemother*. 47:2551-2557.
94. Galani I, Souli M, Koratzanis E, Chrysouli Z, Giamarellou H. 2006. Molecular characterization of an *Escherichia coli* clinical isolate that produces both metallo-beta-lactamase VIM-2 and extended-spectrum beta-lactamase GES-7: identification of the In8 integron carrying the blaVIM-2 gene. *J Antimicrob Chemother*. 58:432-433.
95. Gazouli M, Tzelepi E, Sidorenko SV, Tzouvelekis LS. 1998. Sequence of the gene encoding a plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase (CTX-M-4): involvement of serine 237 in cephalosporin hydrolysis. *Antimicrob Agents Chemother*. 42:1259-1262.
96. Gillings MR. 2013. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome. *Front Microbiol*. 4:4-
97. Girlich D, Poirel L, Carattoli A, Kempf I, Lartigue MF, Bertini A, Nordmann P. 2007. Extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France. *Appl Environ Microbiol*. 73:4681-4685.
98. Gniadkowski M. 2008. Evolution of extended-spectrum beta-lactamases by mutation. *Clin Microbiol Infect*. 14 Suppl 1:11-32.
99. Goossens H, Ferech M, Coenen S, Stephens P. 2007. Comparison of outpatient systemic antibacterial use in 2004 in the United States and 27 European countries. *Clin Infect Dis*. 44:1091-1095.
100. Guthrie VB, Allen J, Camps M, Karchin R. 2011. Network models of TEM beta-lactamase mutations coevolving under antibiotic selection show modular structure and anticipate evolutionary trajectories. *PLoS Comput Biol*. 7:e1002184-
101. Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 166:557-580.
102. Hanson ND and Sanders CC. 1999. Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among Enterobacteriaceae. *Curr Pharm Des*. 5:881-894.
103. Hardwick SA, Stokes HW, Findlay S, Taylor M, Gillings MR. 2008. Quantification of class 1 integron abundance in natural environments using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol Lett*. 278:207-212.
104. Heritage J, M'Zali FH, Gascoyne-Binzi D, Hawkey PM. 1999. Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 44:309-318.
105. Horst JP, Wu TH, Marinus MG. 1999. *Escherichia coli* mutator genes. *Trends Microbiol*. 7:29-36.

106. Howell L and World Economic Forum. 2013. Global risks 2013.
107. Huang Y, Zhuang S, Du M. 2007. Risk factors of nosocomial infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in a neonatal intensive care unit in China. *Infection*. 35:339-345.
108. Jacoby GA and Munoz-Price LS. 2005. The new beta-lactamases. *N Engl J Med*. 352:380-391.
109. Jenkins SG and Jerris RC. 2011. Critical Assessment of Issues Applicable to Development of Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoints. *J Clin Microbiol*. 49:5-10.
110. Jeong SH, Bae IK, Lee JH, Sohn SG, Kang GH, Jeon GJ, Kim YH, Jeong BC, Lee SH. 2004. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean nationwide survey. *J Clin Microbiol*. 42:2902-2906.
111. Johnson JW, Fisher JF, Mobashery S. 2013. Bacterial cell-wall recycling. *Ann N Y Acad Sci*. 1277:54-75.
112. Jorgensen JH and Ferraro MJ. 2000. Antimicrobial susceptibility testing: special needs for fastidious organisms and difficult-to-detect resistance mechanisms. *Clin Infect Dis*. 30:799-808.
113. Juan C, Conejo MC, Tormo N, Gimeno C, Pascual A, Oliver A. 2013. Challenges for accurate susceptibility testing, detection and interpretation of beta-lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa*: results from a Spanish multicentre study. *J Antimicrob Chemother*. 68:619-630.
114. Kalp M, Bethel CR, Bonomo RA, Carey PR. 2009. Why the extended-spectrum beta-lactamases SHV-2 and SHV-5 are "hypersusceptible" to mechanism-based inhibitors. *Biochemistry*. 48:9912-9920.
115. Kang CI, Cha MK, Kim SH, Ko KS, Wi YM, Chung DR, Peck KR, Lee NY, Song JH. 2013. Clinical and molecular epidemiology of community-onset bacteremia caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* over a 6-year period. *J Korean Med Sci*. 28:998-1004.
116. Karfunkel D, Carmeli Y, Chmelnitsky I, Kotlovsky T, Navon-Venezia S. 2013. The emergence and dissemination of CTX-M-producing *Escherichia coli* sequence type 131 causing community-onset bacteremia in Israel. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 32:513-521.
117. Karisik E, Ellington MJ, Pike R, Livermore DM, Woodford N. 2006. Development of high-level ceftazidime resistance via single-base substitutions of blaCTX-M-3 in hyper-mutable *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect*. 12:803-806.
118. Kaye KS, Gold HS, Schwaber MJ, Venkataraman L, Qi Y, De Girolami PC, Samore MH, Anderson G, Rasheed JK, Tenover FC. 2004. Variety of beta-lactamases produced by amoxicillin-clavulanate-resistant *Escherichia coli* isolated in the northeastern United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 48:1520-1525.
119. Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K. 2004. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett*. 230:13-18.
120. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*. 11:315-317.
121. Kotsakis SD, Papagiannitsis CC, Tzelepi E, Legakis NJ, Miriagou V,

- Tzouvelekis LS. 2010. GES-13, a beta-lactamase variant possessing Lys-104 and Asn-170 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:1331-1333.
122. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N. 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 10:597-602.
123. Lagace-Wiens PR, Nichol KA, Nicolle LE, DeCorby M, McCracken M, Mulvey MR, Zhanel GG. 2006. Treatment of lower urinary tract infection caused by multidrug-resistant extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* with amoxicillin/clavulanate: case report and characterization of the isolate. *J Antimicrob Chemother.* 57:1262-1263.
124. LeClerc JE, Li B, Payne WL, Cebula TA. 1996. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science.* 274:1208-1211.
125. LeClerc JE, Payne WL, Kupchella E, Cebula TA. 1998. Detection of mutator subpopulations in *Salmonella typhimurium* LT2 by reversion of his alleles. *Mutat Res.* 400:89-97.
126. Leclercq R, Canton R, Brown DF, Giske CG, Heisig P, Macgowan AP, Mouton JW, Nordmann P, Rodloff AC, Rossolini GM, Soussy CJ, Steinbakk M, Winstanley TG, Kahlmeter G. 2013. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect.* 19:141-160.
127. Leflon-Guibout V, Speldooren V, Heym B, Nicolas-Chanoine M. 2000. Epidemiological survey of amoxicillin-clavulanate resistance and corresponding molecular mechanisms in *Escherichia coli* isolates in France: new genetic features of bla(TEM) genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 44:2709-2714.
128. Lenfant F, Petit A, Labia R, Maveyraud L, Samama JP, Masson JM. 1993. Site-directed mutagenesis of beta-lactamase TEM-1. Investigating the potential role of specific residues on the activity of *Pseudomonas*-specific enzymes. *Eur J Biochem.* 217:939-946.
129. Leplae R, Lima-Mendez G, Toussaint A. 2010. ACLAME: a CLAssification of Mobile genetic Elements, update 2010. *Nucleic Acids Res.* 38:D57-D61.
130. Linares JF, Gustafsson I, Baquero F, Martinez JL. 2006. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:19484-19489.
131. Literacka E, Bedenic B, Baraniak A, Fiett J, Tonkic M, Jajic-Bencic I, Gniadkowski M. 2009. blaCTX-M genes in *Escherichia coli* strains from Croatian Hospitals are located in new (blaCTX-M-3a) and widely spread (blaCTX-M-3a and blaCTX-M-15) genetic structures. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:1630-1635.
132. Livermore DM. 2009. Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother.* 64 Suppl 1:i29-i36.
133. Livermore DM. 2003. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis.* 36:S11-S23.
134. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N. 2007. CTX-M: changing the

face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 59:165-174.

135. Livermore DM, Mushtaq S, Barker K, Hope R, Warner M, Woodford N. 2012. Characterization of beta-lactamase and porin mutants of Enterobacteriaceae selected with ceftaroline + avibactam (NXL104). *J Antimicrob Chemother.* 67:1354-1358.

136. Livermore DM, Struelens M, Amorim J, Baquero F, Bille J, Canton R, Henning S, Gatermann S, Marchese A, Mittermayer H, Nonhoff C, Oakton KJ, Praplan F, Ramos H, Schito GC, Van EJ, Verhaegen J, Verhoef J, Visser MR. 2002. Multicentre evaluation of the VITEK 2 Advanced Expert System for interpretive reading of antimicrobial resistance tests. *J Antimicrob Chemother.* 49:289-300.

137. Lobkovsky AE, Wolf YI, Koonin EV. 2011. Predictability of evolutionary trajectories in fitness landscapes. *PLoS Comput Biol.* 7:e1002302-

138. LoBue P. 2009. Extensively drug-resistant tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis.* 22:167-173.

139. Lodise TP, Jr., Lomaestro B, Rodvold KA, Danziger LH, Drusano GL. 2004. Pharmacodynamic profiling of piperacillin in the presence of tazobactam in patients through the use of population pharmacokinetic models and Monte Carlo simulation. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:4718-4724.

140. López-Cerero L, Picon E, Morillo C, Hernández JR, Docobo F, Pachon J, Rodríguez-Bano J, Pascual A. 2010. Comparative assessment of inoculum effects on the antimicrobial activity of amoxicillin-clavulanate and piperacillin-tazobactam with extended-spectrum beta-lactamase-producing and extended-spectrum beta-lactamase-non-producing *Escherichia coli* isolates. *Clin Microbiol Infect.* 16:132-136.

141. Louie A, Castanheira M, Liu W, Grasso C, Jones RN, Williams G, Critchley I, Thye D, Brown D, Vanscoy B, Kulawy R, Drusano GL. 2012. Pharmacodynamics of beta-lactamase inhibition by NXL104 in combination with ceftaroline: examining organisms with multiple types of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 56:258-270.

142. MacKenzie FM, Gould IM, Bruce J, Mollison J, Monnet DL, Krcmery V, Cookson B, van der Meer JW. 2007. The role of microbiology and pharmacy departments in the stewardship of antibiotic prescribing in European hospitals. *J Hosp Infect.* 65 Suppl 2:73-81.

143. Manageiro V, Ferreira E, Albuquerque L, Bonnet R, Canica M. 2010. Biochemical study of a new inhibitor-resistant beta-lactamase, SHV-84, produced by a clinical *Escherichia coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:2271-2272.

144. Martin O, Valverde A, Morosini MI, Rodriguez-Dominguez M, Rodriguez-Banos M, Coque TM, Canton R, del CR. 2010. Population analysis and epidemiological features of inhibitor-resistant-TEM-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from both community and hospital settings in Madrid, Spain. *J Clin Microbiol.* 48:2368-2372.

145. Martinez JL. 2009. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc Biol Sci.* 276:2521-2530.

146. Martinez JL. 2012. The antibiotic resistome: challenge and opportunity for therapeutic intervention. *Future Med Chem.* 4:347-359.

147. Martinez JL, Baquero F, Andersson DI. 2011. Beyond serial passages: new methods for predicting the emergence of resistance to novel antibiotics. *Curr Opin Pharmacol.* 11:439-445.

148. Martinez JL, Baquero F, Andersson DI. 2007. Predicting antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 5:958-965.
149. Martinez JL, Cercenado E, Rodriguez-Creixems M, Vincente-Perez MF, gado-Iribarren A, Baquero F. 1987. Resistance to beta-lactam/clavulanate. *Lancet.* 2:1473-
150. Martinez-Martinez L, Conejo MC, Pascual A, Hernandez-Alles S, Ballesta S, Ramirez DA-R, Benedi VJ, Perea EJ. 2000. Activities of imipenem and cephalosporins against clonally related strains of *Escherichia coli* hyperproducing chromosomal beta-lactamase and showing altered porin profiles. *Antimicrob Agents Chemother.* 44:2534-2536.
151. Martinez-Martinez L, Hernandez-Alles S, Alberti S, Tomas JM, Benedi VJ, Jacoby GA. 1996. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 40:342-348.
152. Massova I and Mobashery S. 1998. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 42:1-17.
153. Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y. 1988. Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 32:1243-1246.
154. McDermott PF, Walker RD, White DG. 2003. Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *Int J Toxicol.* 22:135-143.
155. McKenna M. 2013. Antibiotic resistance: the last resort. *Nature.* 499:394-396.
156. Mendonca N, Manageiro V, Robin F, Salgado MJ, Ferreira E, Canica M, Bonnet R. 2008. The Lys234Arg substitution in the enzyme SHV-72 is a determinant for resistance to clavulanic acid inhibition. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:1806-1811.
157. Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos (MENSURA). 2000. Recomendaciones del Grupo Mensura para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad y criterios para la interpretación del antibiograma. *Rev Esp Quimioter.* 13:73-86.
158. Meyer E, Schwab F, Schroeren-Boersch B, Gastmeier P. 2010. Dramatic increase of third-generation cephalosporin-resistant *E. coli* in German intensive care units: secular trends in antibiotic drug use and bacterial resistance, 2001 to 2008. *Crit Care.* 14:R113-
159. Miro E, Agüero J, Larrosa MN, Fernandez A, Conejo MC, Bou G, Gonzalez-Lopez JJ, Lara N, Martinez-Martinez L, Oliver A, Aracil B, Oteo J, Pascual A, Rodriguez-Bano J, Zamorano L, Navarro F. 2013. Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC beta-lactamases and carbapenemases in *Enterobacteriaceae* isolates from 35 hospitals in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 32:253-259.
160. Miro E, Segura C, Navarro F, Sorli L, Coll P, Horcajada JP, varez-Lerma F, Salvado M. 2010. Spread of plasmids containing the bla(VIM-1) and bla(CTX-M) genes and the qnr determinant in *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* isolates. *J Antimicrob Chemother.* 65:661-665.
161. Moland ES, Soo-Young Kim MD, Seong Geun Hong MD, Kenneth S.Thomson. 2008. Newer β -Lactamases: Clinical and Laboratory Implications, Part I. *Clinical Microbiology Newsletter.* 30:71-77.

162. Mollenkopf DF, Weeman MF, Daniels JB, Abley MJ, Mathews JL, Gebreyes WA, Wittum TE. 2012. Variable within- and between-herd diversity of CTX-M cephalosporinase-bearing *Escherichia coli* isolates from dairy cattle. *Appl Environ Microbiol.* 78:4552-4560.
163. Morosini MI, Negri MC, Shoichet B, Baquero MR, Baquero F, Blazquez J. 1998. An extended-spectrum AmpC-type beta-lactamase obtained by in vitro antibiotic selection. *FEMS Microbiol Lett.* 165:85-90.
164. Morosini MI, Valverde A, Garcia-Castillo M, Nordmann P, Canton R. 2010. Persistent isolation of *Salmonella* Concord harbouring CTX-M-15, SHV-12 and QnrA1 in an asymptomatic adopted Ethiopian child in Spain also colonized with CTX-M-14- and QnrB-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 65:1545-1546.
165. Mushtaq S, Warner M, Williams G, Critchley I, Livermore DM. 2010. Activity of chequerboard combinations of ceftaroline and NXL104 versus beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 65:1428-1432.
166. Naas T and Nordmann P. 1999. OXA-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des.* 5:865-879.
167. Naas T, Poirel L, Nordmann P. 2008. Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 14 Suppl 1:42-52.
168. Nagano Y, Nagano N, Wachino J, Ishikawa K, Arakawa Y. 2009. Novel chimeric beta-lactamase CTX-M-64, a hybrid of CTX-M-15-like and CTX-M-14 beta-lactamases, found in a *Shigella sonnei* strain resistant to various oxyimino-cephalosporins, including ceftazidime. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:69-74.
169. Nagano Y, Nagano N, Wachino J, Ishikawa K, Arakawa Y. 2009. Novel chimeric beta-lactamase CTX-M-64, a hybrid of CTX-M-15-like and CTX-M-14 beta-lactamases, found in a *Shigella sonnei* strain resistant to various oxyimino-cephalosporins, including ceftazidime. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:69-74.
170. Nardelli M, Scalzo PM, Ramirez MS, Quiroga MP, Cassini MH, Centron D. 2012. Class 1 integrons in environments with different degrees of urbanization. *PLoS One.* 7:e39223-
171. National Nosocomial Infections Surveillance. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report: data summary from January 1992 to June 2002 iA2. 2002. *Am J Infect Control.* 30:458-475.
172. Neuwirth C, Madec S, Siebor E, Pechinot A, Duez JM, Pruneaux M, Fouchereau-Peron M, Kazmierczak A, Labia R. 2001. TEM-89 beta-lactamase produced by a *Proteus mirabilis* clinical isolate: new complex mutant (CMT 3) with mutations in both TEM-59 (IRT-17) and TEM-3. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:3591-3594.
173. Newman D, Scheetz MH, Adeyemi OA, Montevecchi M, Nicolau DP, Noskin GA, Postelnick MJ. 2007. Serum piperacillin/tazobactam pharmacokinetics in a morbidly obese individual. *Ann Pharmacother.* 41:1734-1739.
174. Nichols DA, Jaishankar P, Larson W, Smith E, Liu G, Beyrouthy R, Bonnet R, Renslo AR, Chen Y. 2012. Structure-based design of potent and ligand-efficient inhibitors of CTX-M class A beta-lactamase. *J Med Chem.* 55:2163-2172.
175. Nikaido H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67:593-656.
176. Novais A, Baquero F, Machado E, Canton R, Peixe L, Coque TM. 2010. International spread and persistence of

- TEM-24 is caused by the confluence of highly penetrating enterobacteriaceae clones and an IncA/C2 plasmid containing Tn1696::Tn1 and IS5075-Tn21. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:825-834.
177. Novais A, Canton R, Coque TM, Moya A, Baquero F, Galan JC. 2008. Mutational events in cefotaximase extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M-1 cluster involved in ceftazidime resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:2377-2382.
178. Novais A, Comas I, Baquero F, Canton R, Coque TM, Moya A, Gonzalez-Candelas F, Galan JC. 2010. Evolutionary trajectories of beta-lactamase CTX-M-1 cluster enzymes: predicting antibiotic resistance. *PLoS Pathog.* 6:e1000735-
179. Nussbaum A, Mariano N, Colon-Urban R, Modeste RA, Zahid S, Wehbeh W, Sorana-Segal-Maurer, Urban C. 2013. Microbiologic and Clinical Comparison of Patients Harboring *Escherichia coli* Blood Isolates with and without Extended-Spectrum *beta*-Lactamases . *Advances in Infectious Diseases.* 3:50-54.
180. O'Neill AJ and Chopra I. 2001. Use of mutator strains for characterization of novel antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:1599-1600.
181. Oliver A, Baquero F, Blazquez J. 2002. The mismatch repair system (mutS, mutL and uvrD genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Mol Microbiol.* 43:1641-1650.
182. Oliver A, Coque TM, Alonso D, Valverde A, Baquero F, Canton R. 2005. CTX-M-10 linked to a phage-related element is widely disseminated among Enterobacteriaceae in a Spanish hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:1567-1571.
183. Oliver A, Pérez-Díaz JC, Coque TM, Baquero F, Cantón R. 2001. Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:616-620.
184. Olson AB, Silverman M, Boyd DA, McGeer A, Willey BM, Pong-Porter V, Daneman N, Mulvey MR. 2005. Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:2112-2115.
185. Ortega A, Oteo J, ranzamendi-Zaldumbide M, Bartolome RM, Bou G, Cercenado E, Conejo MC, Gonzalez-Lopez JJ, Marin M, Martinez-Martinez L, Merino M, Navarro F, Oliver A, Pascual A, Rivera A, Rodriguez-Bano J, Weber I, Aracil B, Campos J. 2012. Spanish multicenter study of the epidemiology and mechanisms of amoxicillin-clavulanate resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 56:3576-3581.
186. Oteo J, Bautista V, Lara N, Cuevas O, Arroyo M, Fernandez S, Lazaro E, de Abajo FJ, Campos J. 2010. Parallel increase in community use of fosfomycin and resistance to fosfomycin in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 65:2459-2463.
187. Oteo J, Perez-Vazquez M, Campos J. 2010. Extended-spectrum [beta]-lactamase producing *Escherichia coli*: changing epidemiology and clinical impact. *Curr Opin Infect Dis.* 23:320-326.
188. Pakyz AL, Oinonen M, Polk RE. 2009. Relationship of carbapenem restriction in 22 university teaching hospitals to carbapenem use and carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:1983-1986.

189. Palumbi SR. 2001. Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science*. 293:1786-1790.
190. Paño-Pardo JR, Ruiz-Carrascoso G, Navarro-San FC, Gómez-Gil R, Mora-Rillo M, Romero-Gómez MP, Fernández-Romero N, García-Rodríguez J, Pérez-Blanco V, Moreno-Ramos F, Mingorance J. 2013. Infections caused by OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Spain in the setting of a prolonged, hospital-wide outbreak. *J Antimicrob Chemother*. 68:89-96.
191. Papp-Wallace KM, Taracila M, Hornick JM, Hujer AM, Hujer KM, Distler AM, Endimiani A, Bonomo RA. 2010. Substrate selectivity and a novel role in inhibitor discrimination by residue 237 in the KPC-2 beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 54:2867-2877.
192. Patel G and Bonomo RA. 2013. "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol*. 4:48-
193. Paterson DL and Bonomo RA. 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*. 18:657-686.
194. Perez-Llarena FJ, Cartelle M, Mallo S, Beceiro A, Perez A, Villanueva R, Romero A, Bonnet R, Bou G. 2008. Structure-function studies of arginine at position 276 in CTX-M beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 61:792-797.
195. Philippon A, Labia R, Jacoby G. 1989. Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 33:1131-1136.
196. Pitart C, Sole M, Roca I, Fabrega A, Vila J, Marco F. 2011. First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 55:4398-4401.
197. Pitout JD. 2010. Infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae: changing epidemiology and drug treatment choices. *Drugs*. 70:313-333.
198. Pitout JD and Laupland KB. 2008. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*. 8:159-166.
199. Pitout JD, Le P, Church DL, Gregson DB, Laupland KB. 2008. Antimicrobial susceptibility of well-characterised multiresistant CTX-M-producing *Escherichia coli*: failure of automated systems to detect resistance to piperacillin/tazobactam. *Int J Antimicrob Agents*. 32:333-338.
200. Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. 2005. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother*. 56:52-59.
201. Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. 2002. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *J Antimicrob Chemother*. 50:1031-1034.
202. Poirel L, Naas T, Le T, I, Karim A, Bingen E, Nordmann P. 2001. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. *Antimicrob Agents Chemother*. 45:3355-3361.
203. Poirel L, Naas T, Nordmann P. 2008. Genetic support of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect*. 14 Suppl 1:75-81.
204. Poirel L, Potron A, De La CC, Cleary T, Nordmann P, Munoz-Price LS. 2012. Wild coastline birds as reservoirs of broad-

- p spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Miami Beach, Florida.
- Antimicrob Agents Chemother.*
- 56:2756-2758.
205. Poirel L, Weldhagen GF, De CC, Nordmann P. 2002. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. *J Antimicrob Chemother.* 49:561-565.
206. Poole K. 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 10:12-26.
207. Potron A, Kalpoe J, Poirel L, Nordmann P. 2011. European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clin Microbiol Infect.* 17:E24-E26.
208. Pournaras S, Protonotariou E, Voulgari E, Kristo I, Dimitroulia E, Vitti D, Tsalidou M, Maniatis AN, Tsakris A, Sofianou D. 2009. Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece. *J Antimicrob Chemother.* 64:348-352.
209. Prinarakis EE, Miriagou V, Tzelepi E, Gazouli M, Tzouvelekis LS. 1997. Emergence of an inhibitor-resistant beta-lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob Agents Chemother.* 41:838-840.
210. Qureshi ZA, Paterson DL, Pakstis DL, ms-Haduch JM, Sandkovsky G, Sordillo E, Polsky B, Peleg AY, Bhussar MK, Doi Y. 2011. Risk factors and outcome of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* bloodstream infections. *Int J Antimicrob Agents.* 37:26-32.
211. Retamar P, Lopez-Cerero L, Muniain MA, Pascual A, Rodriguez-Bano J. 2013. Impact of the MIC of Piperacillin-Tazobactam on the Outcome of Patients with Bacteremia Due to Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:3402-3404.
212. Rice LB. 2012. Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to beta-lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. *Mayo Clin Proc.* 87:198-208.
213. Richmond MH and Sykes RB. 1973. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol.* 9:31-88.
214. Ripoll A, Baquero F, Novais A, Rodriguez-Dominguez MJ, Turrientes MC, Canton R, Galan JC. 2011. In vitro selection of variants resistant to beta-lactams plus beta-lactamase inhibitors in CTX-M beta-lactamases: predicting the in vivo scenario? *Antimicrob Agents Chemother.* 55:4530-4536.
215. Rodriguez MM, Power P, Radice M, Vay C, Famiglietti A, Galleni M, Ayala JA, Gutkind G. 2004. Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:4895-4897.
216. Rodriguez-Baño J, Alcalá JC, Cisneros JM, Grill F, Oliver A, Horcajada JP, Tortola T, Mirelis B, Navarro G, Cuenca M, Esteve M, Pena C, Llanos AC, Canton R, Pascual A. 2008. Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Arch Intern Med.* 168:1897-1902.
217. Rodriguez-Baño J, Navarro MD, Retamar P, Picon E, Pascual A. 2012. beta-Lactam/beta-lactam inhibitor combinations for the treatment of bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: a post hoc analysis of prospective cohorts. *Clin Infect Dis.* 54:167-174.

218. Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Muniain MA, de CM, Rios MJ, Hernandez JR, Pascual A. 2006. Bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the CTX-M era: a new clinical challenge. *Clin Infect Dis*. 43:1407-1414.
219. Rodríguez-Bano J, Oteo J, Ortega A, Villar M, Conejo MC, Bou G, ranzamendi-Zaldumbide M, Cercenado E, Gurgui M, Martínez-Martínez L, Merino M, Rivera A, Oliver A, Weber I, Pascual A, Bartolome RM, Gonzalez-Lopez JJ, Campos J. 2013. Epidemiological and Clinical Complexity of Amoxicillin-Clavulanate-Resistant *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 51:2414-2417.
220. Rodríguez-Baño J, Picon E, Gijon P, Hernandez JR, Ruiz M, Pena C, Almela M, Almirante B, Grill F, Colomina J, Gimenez M, Oliver A, Horcajada JP, Navarro G, Coloma A, Pascual A. 2010. Community-onset bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: risk factors and prognosis. *Clin Infect Dis*. 50:40-48.
221. Rodríguez-Villalobos H, Bogaerts P, Berhin C, Bauraing C, Deplano A, Montesinos I, de MR, Jans B, Glupczynski Y. 2011. Trends in production of extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* of clinical interest: results of a nationwide survey in Belgian hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 66:37-47.
222. Rolain JM, Canton R, Cornaglia G. 2012. Emergence of antibiotic resistance: need for a new paradigm. *Clin Microbiol Infect*. 18:615-616.
223. Romero L, López L, Rodríguez-Baño J, Ramón HJ, Martínez-Martínez L, Pascual A. 2005. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect*. 11:625-631.
224. Rossi F, Baquero F, Hsueh PR, Paterson DL, Bochicchio GV, Snyder TA, Satishchandran V, McCarroll K, DiNubile MJ, Chow JW. 2006. In vitro susceptibilities of aerobic and facultatively anaerobic Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: 2004 results from SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends). *J Antimicrob Chemother*. 58:205-210.
225. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. 2008. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect*. 14 Suppl 1:33-41.
226. Sabate M, Tarrago R, Navarro F, Miro E, Verges C, Barbe J, Prats G. 2000. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 44:1970-1973.
227. Sato M, Machida K, Arikado E, Saito H, Kakegawa T, Kobayashi H. 2000. Expression of outer membrane proteins in *Escherichia coli* growing at acid pH. *Appl Environ Microbiol*. 66:943-947.
228. Schwaber MJ and Carmeli Y. 2008. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a potential threat. *JAMA*. 300:2911-2913.
229. Seyler L, Cotton F, Taccone FS, De BD, Macours P, Vincent JL, Jacobs F. 2011. Recommended beta-lactam regimens are inadequate in septic patients treated with continuous renal replacement therapy. *Crit Care*. 15:R137-
230. Shea KM, Cheatham SC, Smith DW, Wack MF, Sowinski KM, Kays MB. 2009. Comparative pharmacodynamics of intermittent and prolonged infusions of piperacillin/tazobactam using Monte Carlo simulations and steady-state pharmacokinetic data from hospitalized patients. *Ann Pharmacother*. 43:1747-1754.

231. Shiraki Y, Shibata N, Doi Y, Arakawa Y. 2004. Escherichia coli producing CTX-M-2 beta-lactamase in cattle, Japan. *Emerg Infect Dis.* 10:69-75.
232. Simarro E, Navarro F, Ruiz J, Miro E, Gomez J, Mirelis B. 2000. Salmonella enterica serovar virchow with CTX-M-like beta-lactamase in Spain. *J Clin Microbiol.* 38:4676-4678.
233. Sirot D, Labia R, Pouedras P, Chanal-Claris C, Cerceau C, Sirot J. 1998. Inhibitor-resistant OXY-2-derived beta-lactamase produced by Klebsiella oxytoca. *Antimicrob Agents Chemother.* 42:2184-2187.
234. Sirot D, Recule C, Chaibi EB, Bret L, Croize J, Chanal-Claris C, Labia R, Sirot J. 1997. A complex mutant of TEM-1 beta-lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an Escherichia coli clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 41:1322-1325.
235. Sirot D, Sirot J, Labia R, Morand A, Courvalin P, rfeuille-Michaud A, Perroux R, Cluzel R. 1987. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 20:323-334.
236. Skurnik D, Ruimy R, Andremont A, Amorin C, Rouquet P, Picard B, Denamur E. 2006. Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal Escherichia coli. *J Antimicrob Chemother.* 57:1215-1219.
237. Sommer MO, Dantas G, Church GM. 2009. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science.* 325:1128-1131.
238. Sougakoff W, Goussard S, Gerbaud G, Courvalin P. 1988. Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. *Rev Infect Dis.* 10:879-884.
239. Spratt BG, Hedge PJ, te HS, Edelman A, Broome-Smith JK. 1986. Kanamycin-resistant vectors that are analogues of plasmids pUC8, pUC9, pEMBL8 and pEMBL9. *Gene.* 41:337-342.
240. Stapleton PD, Shannon KP, French GL. 1999. Construction and characterization of mutants of the TEM-1 beta-lactamase containing amino acid substitutions associated with both extended-spectrum resistance and resistance to beta-lactamase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 43:1881-1887.
241. Sturenburg E, Kuhn A, Mack D, Laufs R. 2004. A novel extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-23 with a P167T substitution in the active-site omega loop associated with ceftazidime resistance. *J Antimicrob Chemother.* 54:406-409.
242. Sun Y, Zeng Z, Chen S, Ma J, He L, Liu Y, Deng Y, Lei T, Zhao J, Liu JH. 2010. High prevalence of bla(CTX-M) extended-spectrum beta-lactamase genes in Escherichia coli isolates from pets and emergence of CTX-M-64 in China. *Clin Microbiol Infect.* 16:1475-1481.
243. Taccone FS, Laterre PF, Dugernier T, Spapen H, Delattre I, Wittebole X, De BD, Layeux B, Wallemacq P, Vincent JL, Jacobs F. 2010. Insufficient beta-lactam concentrations in the early phase of severe sepsis and septic shock. *Crit Care.* 14:R126-
244. Tam VH, McKinnon PS, Akins RL, Rybak MJ, Drusano GL. 2002. Pharmacodynamics of cefepime in patients with Gram-negative infections. *J Antimicrob Chemother.* 50:425-428.
245. Tangden T, Adler M, Cars O, Sandegren L, Lowdin E. 2013. Frequent emergence of porin-deficient

- subpopulations with reduced carbapenem susceptibility in ESBL-producing *Escherichia coli* during exposure to ertapenem in an in vitro pharmacokinetic model. *J Antimicrob Chemother.*
246. Tato M, Coque TM, Ruiz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J, Sader HS, Jones RN, Baquero F, Canton R. 2007. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of Enterobacteriaceae infection involving VIM-1 metallo-beta-lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin Infect Dis.* 45:1171-1178.
247. Tenover FC. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control.* 34:S3-10.
248. Tenover FC, Mohammed MJ, Gorton TS, Dembek ZF. 1999. Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: survey of laboratories in Connecticut. *J Clin Microbiol.* 37:4065-4070.
249. Tenover FC, Mohammed MJ, Stelling J, O'Brien T, Williams R. 2001. Ability of laboratories to detect emerging antimicrobial resistance: proficiency testing and quality control results from the World Health Organization's external quality assurance system for antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 39:241-250.
250. Thaller MC, Migliore L, Marquez C, Tapia W, Cedeno V, Rossolini GM, Gentile G. 2010. Tracking acquired antibiotic resistance in commensal bacteria of Galapagos land iguanas: no man, no resistance. *PLoS One.* 5:e8989-
251. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Extended QC Tables. Version 1.3, 2013. <http://eucast.org>.
252. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1, 2013. <http://www.eucast.org>.
253. Thomson KS and Moland ES. 2001. Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in tests with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:3548-3554.
254. Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. 2006. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol Mol Biol Rev.* 70:296-316.
255. Torres-Cortes G, Millan V, Ramirez-Saad HC, Nisa-Martinez R, Toro N, Martinez-Abarca F. 2011. Characterization of novel antibiotic resistance genes identified by functional metagenomics on soil samples. *Environ Microbiol.* 13:1101-1114.
256. Tumbarello M, Sali M, Trecarichi EM, Leone F, Rossi M, Fiori B, De PG, D'Inzeo T, Sanguinetti M, Fadda G, Cauda R, Spanu T. 2008. Bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: risk factors for inadequate initial antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:3244-3252.
257. Valverde A, Coque TM, Sánchez-Moreno MP, Rollan A, Baquero F, Cantón R. 2004. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. *J Clin Microbiol.* 42:4769-4775.
258. Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, Karageorgopoulos DE, Vrioni G, Mamali V, Themeli-Digalaki K, Tsakris A. 2013. Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. *J Antimicrob Chemother.* 68:84-88.
259. Wachino J, Yamane K, Suzuki S, Kimura K, Arakawa Y. 2010. Prevalence of

- fosfomycin resistance among CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Japan and identification of novel plasmid-mediated fosfomycin-modifying enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:3061-3064.
260. Wang XD, Cai JC, Zhou HW, Zhang R, Chen GX. 2009. Reduced susceptibility to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates associated with plasmid-mediated beta-lactamase production and OmpK36 porin deficiency. *J Med Microbiol.* 58:1196-1202.
261. Weinreich DM, Delaney NF, Depristo MA, Hartl DL. 2006. Darwinian evolution can follow only very few mutational paths to fitter proteins. *Science.* 312:111-114.
262. Welsh KJ, Barlow M, Tenover FC, Biddle JW, Rasheed JK, Clark LA, McGowan JE, Jr. 2005. Experimental prediction of the evolution of ceftazidime resistance in the CTX-M-2 extended-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:1242-1244.
263. Wener KM, Schechner V, Gold HS, Wright SB, Carmeli Y. 2010. Treatment with fluoroquinolones or with beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations is a risk factor for isolation of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella* species in hospitalized patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:2010-2016.
264. Winstanley T and Courvalin P. 2011. Expert systems in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 24:515-556.
265. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.* 39:309-317.
266. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 35:736-755.
267. Wright GD. 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol.* 5:175-186.
268. Wright GD. 2010. The antibiotic resistome. *Expert Opin Drug Discov.* 5:779-788.
269. Wright J and Azadian B. 2013. Cephalosporin resistance in gonorrhoea. *The Lancet Infectious Diseases.*
270. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. 2013. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents.* 41:11-19.
271. Zimhony O, Chmelnitsky I, Bardenstein R, Goland S, Hammer MO, Navon VS, Carmeli Y. 2006. Endocarditis caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: emergence of resistance to ciprofloxacin and piperacillin-tazobactam during treatment despite initial susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:3179-3182.

ANEXOS

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMC	Amoxicilina-clavulánico
AMP	Ampicilina
AST	<i>Antimicrobial susceptibility testing</i>
ATM	Aztreonam
BLEE	β -Lactamasas de Espectro Extendido
BLiBL	Combinación de β -lactámico más un inhibidor de β -lactamasa
CAZ	Ceftazidima
CEF	Cefalotina
CFZ	Cefazolina
CHL	Cloranfenicol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CM-CTX-M	<i>Complex Mutant-CTX-M</i>
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMT	<i>Complex Mutant TEM</i>
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima
CXM	Cefuroxima
ECCMID	<i>European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i>
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
ECOFF	<i>epidemiological cut-off</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EGM	Elementos genéticos móviles
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Agencia Europea de Medicamentos)
ESCMID	<i>European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i>
ETP	Ertapenem
EUCAST	<i>European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FEP	Cefepime
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

FOX	Cefoxitina
IMP	Imipenem
IR-CTX-M	<i>Inhibitor Resistant-CTX-M</i>
IRT	<i>Inhibitor Resistant TEM</i>
Kan	Kanamicina
LB	Luria Bertani
MEM	Meropenem
MPC	<i>Mutant prevention concentration</i>
MSW	<i>Mutant selection window</i>
OMS	Organización mundial de la Salud
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PK/PD	Parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos
PTZ	Piperacilin-tazobactam
rpm	revoluciones por minuto
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina
SEIMC	Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica
TIC	Ticarcilina
ufc/ml	Unidades formadoras de colonia por mililitro
WEF	Foro anual de Economía Mundial

PUBLICACIONES

Artículos originales.

Aida Ripoll, Baquero F, Novais A, Rodríguez-Domínguez MJ, Turrientes MC, Cantón R and Galán JC. "In vitro selection of variants resistant to beta-lactams plus beta-lactamase inhibitors in CTX-M beta-lactamases: predicting the in vivo scenario?" *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Oct; 55(10):4530-6.

Aida Ripoll, Galán JC, Rodríguez C, Tormo N, Gimeno C, Baquero F, Martínez-Martínez L, Cantón R and SEIMC Quality Control Study Group. Detection of Resistance to Beta-Lactamase Inhibitors in Strains with CTX-M beta-Lactamases: a Multicenter Quality Control Assessment Using a Well-Defined Collection of *Escherichia coli* Strains. *Journal Antimicrob Chemother.* En revisión editorial (enviado en Julio de 2013).

Manuscrito en preparación (presentado en congresos)

Aida Ripoll, Baquero F, Turrientes MC, Cantón R, Galán JC. Emergence of subpopulations with reduced piperacillin-tazobactam susceptibility in ESBL-producing *Escherichia coli* through time-kill experiments. Presentado en la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Bilbao 2012. Póster 699. Artículo en preparación.

In Vitro Selection of Variants Resistant to β -Lactams plus β -Lactamase Inhibitors in CTX-M β -Lactamases: Predicting the *In Vivo* Scenario?[∇]

Aida Ripoll,¹ Fernando Baquero,^{1,2} Ângela Novais,^{1,3} Mario J. Rodríguez-Domínguez,¹
Maria-Carmen Turrientes,¹ Rafael Cantón,^{1,2} and Juan-Carlos Galán^{1,2*}

Servicio de Microbiología and CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain¹; Unidad de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana (RYC-CSIC), Madrid, Spain²; and REQUIMTE, Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal³

Received 10 February 2011/Returned for modification 25 April 2011/Accepted 16 July 2011

CTX-M β -lactamases are the most prevalent group of enzymes within the extended-spectrum β -lactamases (ESBL). The therapeutic options for CTX-M-carrying isolates are scarce, forcing the reexamination of the therapeutic possibilities of β -lactams plus β -lactamase inhibitors (BBLIs). Inhibitor-resistant CTX-M β -lactamases (IR-CTX-M) have not hitherto been described in natural isolates. In this study, 168 cultures of the hypermutagenic *Escherichia coli* GB20 strain carrying plasmid pBGS18 with different *bla*_{CTX-M} genes were submitted to parallel experimental evolution assays in the presence of increasing concentrations of a combination of amoxicillin and clavulanate. Fourteen CTX-M β -lactamases belonging to the three most representative clusters (CTX-M-1, -2, and -9) and the two main phenotypes (cefotaxime resistance and cefotaxime-ceftazidime resistance) were studied. Three types of IR-CTX-M mutants were detected, having mutations S130G, K234R, and S237G, which are associated with different resistance patterns. The most frequently recovered mutation was S130G, which conferred the highest resistance levels to BBLIs (reaching 12 μ g/ml for amoxicillin-clavulanate and 96 μ g/ml for piperacillin-tazobactam when acquired by CTX-M-1 cluster enzymes). The S130G change also provided a clear antagonistic pleiotropy effect, strongly decreasing the enzyme's activity against all cephalosporins tested. A double mutation, S130G L169S, partially restored the resistance against cephalosporins. A complex pattern observed in CTX-M-58, carrying P167S and S130G or K234R changes, conferred ESBL and IR phenotypes simultaneously. The K234R and S237G changes had a smaller effect in providing inhibitor resistance. In summary, IR-CTX-M enzymes might evolve under exposure to BBLIs, and the probability is higher for enzymes belonging to the CTX-M-1 cluster. However, this process could be delayed by antagonistic pleiotropy.

The production of β -lactamases is the most important mechanism of resistance against β -lactam antibiotics in Gram-negative bacteria (20). At present, the most diverse and growing groups of enzymes are class A and D β -lactamases, due to the increased burden of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and carbapenemases (5). Since 2000, *Enterobacteriaceae* producing CTX-M enzymes (belonging to class A ESBLs) have increased worldwide, reaching 70 to 90% of all ESBL-producing strains in many areas of the world (9, 12, 19, 35). Because CTX-M-producing strains often confer resistance to many other antimicrobial agents, they constitute one of the most worrying problems in antimicrobial chemotherapy and, in the long run, in public health (7, 10, 25, 33, 44, 57). The current empirical treatment of infections caused by CTX-M-producing organisms is based on carbapenems for severe infections (39, 43) and some non- β -lactam antibiotics, such as fosfomycin, for the treatment of uncomplicated urinary tract infections (15). The increasing frequency of clinical isolates carrying CTX-M enzymes implies a significant rise in the consumption of these antibiotics (38, 40), which is being followed by resistance to

these agents in CTX-M-producing strains (8, 31, 38). Indeed, the CTX-M-induced overconsumption of carbapenems and fosfomycin may have contributed to the selection and spread of novel mechanisms of resistance, such as KPC (11, 47) or NDM carbapenemases (61) and FosA3 and FosC2 enzymes involved in fosfomycin resistance (58).

Combinations of β -lactams plus β -lactamase inhibitors (BBLIs) remain active *in vitro* against a high proportion of CTX-M-producing *Enterobacteriaceae*, but their use in the treatment of infections caused by these organisms is still controversial (44, 49, 51, 52). The present epidemiological situation has forced a reexamination of the therapeutic possibilities of BBLIs, some of which suggest a positive effect both in severe and in uncomplicated infections (50, 56). The current resistance rates to BBLIs in Europe account for 12% and 25% of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains, respectively (12, 53). In a number of CTX-M-producing *Enterobacteriaceae*, as frequently happens for CTX-M-15 producers, BBLI resistance is associated with the coproduction of OXA-1 β -lactamase (10) or porin loss (59), whereas no natural CTX-M enzyme has been found to confer resistance to BBLIs (6). The purpose of this work was to evaluate the risk of different CTX-M enzymes giving rise to inhibitor-resistant (IR) protein variants by applying *in vitro* evolution experiments. The hypermutable *E. coli* strain GB20 was transformed with recombinant plasmids derivative of pBGS18 carrying 14

* Corresponding author. Mailing address: Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Carretera de Colmenar, km. 9.1, Madrid 28034, Spain. Phone: 34-913368330. Fax: 34-913368809. E-mail: jgalanm.hrc@salud.madrid.org.

[∇] Published ahead of print on 25 July 2011.

TABLE 1. Primers used in this study

Primers	CTX-M	Nucleotide sequence (5'-3') ^a
CTX-M-14_EcoRI-Fw		GGAATTCGAATACTGATGTAACACGGATT
CTX-M-14_BamHI-Rv		CGGGATCCTTACAGCCCTTCGGCGATGA
CTX-M-2_EcoRI-Fw		GGAATTCACCTTGAAGGCCGAGGGATAA
CTX-M-2_BamHI-Rv		CGGGATCCCGCTCCATTTATTGCATCAGA
CTX-M-2_P167S_F	CTX-M-35	AACCGAGTCCACGCTCAATA
CTX-M-2_P167S_R	CTX-M-35	TGAGCGTGGACTCGGTTCT
CTX-M-2_D240G_F	CTX-M-43-like	AACCGGCAGCGGAGGTTATG
CTX-M-2_D240G_R	CTX-M-43-like	AACCTCCGCTGCCGGTTTTAT
CTX-M-14_P167S_F	CTX-M-19	ATCGCACTGAATCTACGCTGAATA
CTX-M-14_P167S_R	CTX-M-19	ATTCAGCGTAGATTCACTGCGAT
CTX-M-14_D240G_F	CTX-M-27	GCGGCTACGGCACCACCAAT
CTX-M-14_D240G_R	CTX-M-27	TAGCCGCCGCTGCCGGTCTT

^a EcoRI and BamHI restriction sites are underlined in CTX-M EcoRI-Fw and CTX-M BamHI-Rv primers. These primers do not include promoter regions.

different *bla*_{CTX-M} genes and submitted to sequential passages in the presence of increasing concentrations of amoxicillin plus clavulanate (AMC). Several mutations in *bla*_{CTX-M} genes providing a BBli resistance phenotype were characterized. These results indicate that, despite its apparent absence in the clinical setting, bacterial strains carrying *bla*_{CTX-M} might develop variant BBli-resistant enzymes under exposure to BBli agents.

MATERIALS AND METHODS

Cloning of *bla*_{CTX-M} genes. Two groups of *bla*_{CTX-M} genes were established according to their cefotaxime (CTX) and ceftazidime (CAZ) resistance phenotypes. The first was the Ctx^r Caz^s group, i.e., *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-3}, and *bla*_{CTX-M-10} from the CTX-M-1 cluster, *bla*_{CTX-M-9} and *bla*_{CTX-M-14} from the CTX-M-9 cluster, and *bla*_{CTX-M-2} from the CTX-M-2 cluster. The second, the Ctx^r Caz^s group, was subclassified according to the change involved in CAZ resistance, either by means of the D240G change, i.e., *bla*_{CTX-M-32}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-27}, and *bla*_{CTX-M-43}-like (respectively derived by directed mutagenesis from *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-14}, and *bla*_{CTX-M-2}) (36), or the P167S change, i.e., *bla*_{CTX-M-58}, *bla*_{CTX-M-62}, *bla*_{CTX-M-19}, and *bla*_{CTX-M-35} (derived by directed mutagenesis from *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-14}, and *bla*_{CTX-M-2}, respectively) (36).

The *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-10}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-32}, *bla*_{CTX-M-58}, and *bla*_{CTX-M-62} genes were cloned (without their natural promoter regions) into the pBGS18 plasmid (Km^r) and introduced into *E. coli* M11443, an *ΔampC* strain with a mutation rate close to modal value, defined as a normo-mutator strain (37), and into *E. coli* GB20, its isogenic hypermutable tetracycline-resistant derivative (*ΔampC* *mutS::Tn10*) (16). Similarly, the *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-19}, *bla*_{CTX-M-27}, *bla*_{CTX-M-43}-like, and *bla*_{CTX-M-35} genes were cloned into pBGS18 using specific primers with EcoRI and BamHI restriction sites (Table 1) and introduced by transformation into plasmid-free M11443 and GB20 recipient strains.

Serial passages at growing concentrations of AMC. Twelve independent colonies of *E. coli* GB20 transformant strains carrying pBGS18 with a particular *bla*_{CTX-M} gene were inoculated in parallel in 12 deep wells (deepwell plate; Eppendorf, Hamburg, Germany) containing 1.8 ml of Luria Bertani (LB) broth with tetracycline (20 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml), and increasing (2-fold) amoxicillin concentrations (1 to 128 µg/ml) and a fixed concentration of 2 µg/ml of clavulanate, starting from a 2-fold lower concentration than the corresponding original MIC. After 24 h under gentle agitation (180 rpm) at 37°C, 18-µl amounts were transferred from their respective overnight cultures to 1.8 ml of fresh medium (1:100 dilution) in a new deepwell plate containing 2× the previous amoxicillin concentration until reaching 128/2 µg/ml of AMC. Positive cultures growing at that concentration were then submitted to serial passages, fixing the amoxicillin concentration at 128 µg/ml and increasing the clavulanate concentration from 2 to 64 µg/ml stepwise. For each CTX-M evolution experiment, plasmid DNA was extracted from four independent deep wells grown at 128/8 and 64/2 µg/ml of AMC concentrations (except for bacterial strains carrying the *bla*_{CTX-M-1} gene, which were also analyzed at 128/64 µg/ml) using a QIAprep spin miniprep kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) and transformed into *E. coli* strain M11443, using AMC (2-fold higher than the MIC of the receptor strain containing the corresponding nonevolved plasmid) and kanamycin (50 µg/ml) as selector agents. For each of these transformations, three clones were selected

and the DNA plasmids were reextracted and retransformed in M11443 but were selected only using kanamycin (50 µg/ml) to confirm that the increases in MICs were due to mutations in the corresponding CTX-M enzymes. This yielded 24 studied clones per evolved *bla*_{CTX-M} type for the 64/2 and 128/8 µg/ml concentrations and 12 clones for the 128/64 µg/ml concentration (which was reached only by evolved clones harboring *bla*_{CTX-M-1}). The BBli (AMC and piperacillin-tazobactam [TZP]) MICs of these clones were determined, and *bla*_{CTX-M} genes from transformants showing increased BBli MICs were fully sequenced. In order to exclude the possibility of MIC increases due to increased plasmid copy numbers and, therefore, a gene-dosing effect of *bla*_{CTX-M} genes, the evolved plasmids were digested and recloned in a fresh pBGS18 plasmid obtained from an *E. coli* strain not previously exposed to β-lactam antibiotics. The new constructions were retransformed into the M11443 *E. coli* laboratory strain, and the MICs were determined again. These final MIC values are the ones given in Results.

To test the possibility of emergence of novel mutations able to restore the loss of activity against CTX in IR-CTX-M enzymes, eight independent experimental cultures from each plasmid carrying mutated *bla*_{CTX-M} genes [*bla*_{CTX-M}(S130G), *bla*_{CTX-M}(S237G), and *bla*_{CTX-M}(K234R)] derived from wild-type *bla*_{CTX-M} genes belonging to the Ctx^r Caz^s group were submitted to daily serial passages in fixed AMC concentrations (MIC_{AMC} for each case) plus increasing concentrations of CTX, ranging from 2-fold lower than the corresponding MIC_{CTX} to 196 µg/ml or no growth (range, 0.012 to 196 µg/ml). Tetracycline and kanamycin were each added at a fixed concentration (20 µg/ml and 50 µg/ml, respectively). Plasmid DNA was extracted from cultures growing at the highest CTX concentrations for each type of mutant, 0.192 and 0.384 µg/ml in the case of IR-CTX-Ms carrying the S130G change, 3 and 25 µg/ml when the IR-CTX-M harbored the K234R mutation, and 49 and 196 µg/ml in mutants carrying the S237G change.

Susceptibility testing. MICs for *E. coli* M11443 carrying the original and mutated *bla*_{CTX-M} genes were determined using Etest strips, following the manufacturer's instructions (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). The antibiotics tested were cefuroxime (CXM), CTX, cefepime (FEP), CAZ, imipenem (IMP), amoxicillin-clavulanate (AMC), and piperacillin-tazobactam (TZP). The final MIC values are the means of two independent measures. The reference strains used as controls were ATCC 25922, ATCC 35218, and ATCC 27853. Clavulanic acid solution was always stored in 1.4-ml aliquots at -80°C to avoid reutilization of the stock dilution. Moreover, in order to ensure that clavulanic acid retained potency during serial passages, macrodilution amoxicillin-clavulanate (2:1) inhibition assays were performed at the middle time and at the end of each experiment using the control strain ATCC 35218.

GenBank sequence accession numbers. The nucleotide sequences of CTX-M enzymes obtained in the *in vitro* evolution experiments were deposited in GenBank with accession numbers as follows: CTX-M-1(S130G), HQ734697; CTX-M-1(S237G), HQ734698; CTX-M-3(S130G), HQ734699; CTX-M-3(S237G), HQ734700; CTX-M-10(S130G), HQ734701; CTX-M-10(S130G L169S), HQ734702; CTX-M-9(S130G), HQ734703; CTX-M-14(S130G), HQ734704; CTX-M-14(K234R), HQ734705; CTX-M-32(S130G), HQ734706; CTX-M-58(S130G), HQ734707; CTX-M-58(K234R), HQ734708; CTX-M-15(S130G), HQ734709; CTX-M-62(K234R), HQ734710; CTX-M-27(S130G), HQ734711; CTX-M-19(S130G), HQ734712; CTX-M-43-like(S130G), HQ734713; and CTX-M-35(S130G), HQ734714.

TABLE 2. β -Lactam susceptibilities of *E. coli* MI1443 mutants carrying CTX-M inhibitor-resistant mutant enzymes conferring a Ctx^r Caz^s phenotype

CTX-M natural variant	Mutation ^a	Rate of recovery of mutant (%)	MIC (μ g/ml) ^b						
			AMC ^c	TZP ^d	CTX	CAZ	FEP	CXM	IMP
CTX-M-1			4	1	≥ 256	3	24	≥ 256	0.25
	CTX-M-1(S130G)	93.5	12	96	0.023	0.19	0.023	2	0.19
	CTX-M-1(S237G)	6.5	8	1.5	≥ 256	4	6	≥ 256	0.25
CTX-M-3			2	1	24	1	3	≥ 256	0.25
	CTX-M-3(S130G)	86.9	12	12	0.023	0.125	0.023	2	0.19
	CTX-M-3(S237G)	13.1	4	1.5	16	1.5	1	≥ 256	0.19
CTX-M-10			2	1	16	0.38	0.5	≥ 256	0.125
	CTX-M-10(S130G)	100	12	64	0.032	0.19	0.047	4	0.25
CTX-M-9			3	1	12	0.75	0.5	≥ 256	0.19
	CTX-M-9(S130G)	100	8	4	0.032	0.25	0.064	2	0.19
CTX-M-14			3	0.75	48	0.38	1	≥ 256	0.19
	CTX-M-14(S130G)	53.8	6	4	0.032	0.19	0.023	2	0.25
	CTX-M-14(K234R)	46.2	6	1.5	0.25	0.25	1	24	0.19
None ^e			1.5	1	0.032	0.25	0.023	3	0.19

^a CTX-M mutations obtained in the *in vitro* evolution experiments.

^b MICs were determined by Etest for each antibiotic. AMC, amoxicillin-clavulanate; TZP, piperacillin-tazobactam; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; CXM, cefuroxime; IMP, imipenem.

^c AMC was used at a 2:1 ratio.

^d Tazobactam was used at a fixed concentration of 4 μ g/ml.

^e The MI1443 laboratory strain harboring the pBGS18 plasmid vector without the CTX-M gene was used.

RESULTS

Experimental evolution of *bla*_{CTX-M} genes providing the Ctx^r Caz^s phenotype at increasing concentrations of AMC. Twelve replicates of *E. coli* GB20 carrying pBGS18 with each of the different *bla*_{CTX-M} genes belonging to the Ctx^r Caz^s group (*bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-10}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-14}, and *bla*_{CTX-M-2}) were subjected to serial passages at increasing AMC concentrations (see Materials and Methods). Three different types of BBLI-resistant mutants were detected.

The first mutant presented the replacement of serine by glycine on position 130, resulting from an A397→G397 nucleotide change. This S130G mutation was recovered from cultures growing in all AMC concentrations tested and for every CTX-M studied, except for CTX-M-2. The A397→G397 change was selected in 86.9% of *bla*_{CTX-M-3}, 93.5% of *bla*_{CTX-M-1}, 100% of *bla*_{CTX-M-10}, 53.8% of *bla*_{CTX-M-14}, and 100% of *bla*_{CTX-M-9} AMC-resistant mutant clones. In all cases, a similar phenotypic pattern resulting from this change was observed, with increasing resistance to AMC (2- to 6-fold increase) and TZP (4- to 96-fold increase) and total abolishment of resistance to all cephalosporins analyzed (Table 2). The highest MIC values were observed for CTX-M-1 cluster derivatives [CTX-M-1(S130G), CTX-M-3(S130G), and CTX-M-10(S130G)].

The second mutant detected was due to the replacement of lysine by arginine on position 234, resulting from an A710→G710 nucleotide transition, and was only found in clones harboring *bla*_{CTX-M-14}. The K234R change was found in only 46.2% of all evolved mutant clones harboring the *bla*_{CTX-M-14} gene at 128/8 and 64/2 μ g/ml of AMC. MI1443 carrying CTX-M-14(K234R) showed a 2-fold increase in AMC and TZP MICs (Table 2) but, simultaneously, an increase in the susceptibility against all tested cephalosporins except FEP was observed (192-, 11-, and 2-fold decreases of the CTX, CXM, and

CAZ MICs, respectively). This antagonistic effect was less patent than in variants carrying the S130G change.

The third mutant also carried only one nonsynonymous nucleotide transition (A718→G718), which was responsible for the amino acid change from serine to glycine on position 237. This S237G mutant was only detected at 64/2 μ g/ml of AMC from those evolution experiments involving CTX-M-1 and CTX-M-3 (6.5% and 13.1%, respectively). This S237G change resulted in a slight MIC_{AMC} increase (only 2-fold), without detectable effect on the TZP resistance level (Table 2). This change did not affect the CTX, CAZ, or CXM MICs, although a certain reduction in activity was observed against FEP (~4-fold). This reduction was less pronounced than in the case of mutants carrying the S130G and K234R changes.

Experimental evolution of *bla*_{CTX-M} genes providing a Ctx^r Caz^r phenotype, using increasing concentrations of AMC. Two types of mutants are known to confer increased hydrolytic activity against CAZ in the CTX-M β -lactamase group; these correspond to those carrying the D240G or P167T/S change (4, 37). Among the evolved AMC-resistant variants harboring CTX-M enzymes with the D240G change included in this study (encoded by *bla*_{CTX-M-32}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-27}, and *bla*_{CTX-M-43}-like genes), only the S130G mutation was detected. Among the evolved AMC-resistant variants encoding CTX-M with the P167S change (encoded by *bla*_{CTX-M-58}, *bla*_{CTX-M-62}, *bla*_{CTX-M-19}, and *bla*_{CTX-M-35}), two types of mutations were detected, S130G and K234R. All variants carrying the S130G change showed a 3- to 5-fold MIC increase for AMC and a 2- to 12-fold increase for TZP. This mutation was associated with a strong reduction in MICs for all cephalosporins tested, except in the CTX-M-58 enzyme carrying P167S and S130G changes, which conferred ESBL and IR phenotypes simultaneously (Table 3). This reduction was more striking when the D240G change was also present.

Variants carrying the K234R change yielded a 2.7- to 5-fold

TABLE 3. β -Lactam susceptibilities of *E. coli* M11443 mutants carrying CTX-M inhibitor-resistant mutant enzymes conferring a Ctx^r Caz^r phenotype

CTX-M natural variant	Original CTX-M mutation ^a	Mutation ^b	Rate of recovery of mutant (%)	MIC (μ g/ml) ^c						
				AMC ^d	TZP ^e	CTX	CAZ	FEP	CXM	IMP
CTX-M-32	CTX-M-1(D240G)			1.5	0.75	48	2	1.5	≥ 256	0.25
		CTX-M-32(S130G)	100	6	4	0.023	0.125	0.032	2	0.125
CTX-M-15	CTX-M-3(D240G)			1.5	1	32	1.5–2	1	≥ 256	0.25
		CTX-M-15(S130G)	100	8	8	0.032	0.019	0.032	2	0.19
CTX-M-27	CTX-M-14(D240G)			1.5	1	≥ 256	4	4	≥ 256	0.25
		CTX-M-27(S130G)	100	6	2	0.032	0.19	0.032	2	0.25
CTX-M-43-like ^f	CTX-M-2(D240G)			1.5	0.75	≥ 256	2	6	≥ 256	0.25
		CTX-M-43-like(S130G)	100	6	2	0.032	0.19	0.032	2	0.25
CTX-M-58	CTX-M-1(P167S)			3	1	4	96	3–4	≥ 256	0.25
		CTX-M-58(S130G)	63.3	8	12	0.064	24	1.5	2	0.25
		CTX-M-58(K234R)	36.7	8	1	2	64	1	24	0.25
CTX-M-62	CTX-M-3(P167S)			1.5	1	1.5	12	0.5	32	0.19
		CTX-M-62(K234R)	100	8	1.5	2	32	1.5	32	0.25
CTX-M-19	CTX-M-14(P167S)			2	0.75	2	6–8	0.75	64	0.25
		CTX-M-19(S130G)	100	8	3	0.032	3	0.125	2	0.19
CTX-M-35	CTX-M-2(P167S)			2	1	1.5	12	0.25	48	0.19
		CTX-M-35(S130G)	100	6	3	0.032	3	0.064	2	0.19
None ^g				1.5	1	0.032	0.25	0.023	3	0.19

^a Original CTX-M enzyme and mutation involved in the Caz^r phenotype.

^b CTX-M mutations obtained in the *in vitro* evolution experiments.

^c MIC obtained for each antibiotic. AMC, amoxicillin-clavulanate; TZP, piperacillin-tazobactam; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; CXM, cefuroxime; IMP, imipenem.

^d AMC was used at a 2:1 ratio.

^e Tazobactam was used at a fixed concentration of 4 μ g/ml.

^f CTX-M-2(D240G) has not been isolated in nature; this variant was originated and called CTX-M-43-like and differed from CTX-M-43 in having a serine instead of an arginine in the 274 position.

^g The M11443 laboratory strain harboring the pBGS18 plasmid vector without the CTX-M gene was used.

MIC increase for AMC and were weak (1.5-fold) or null for TZP. The CTX-M-62(K234R) variant yielded increased resistance to CAZ (2.6-fold) and FEP (3-fold); no changes were observed in the MIC values for CTX or CXM. The CTX-M-58(K234R) mutation maintained the activity against CAZ and also conferred high MIC values against AMC.

Experimental evolution of *bla*_{CTX-M} genes providing AMC resistance at increasing concentrations of CTX. Mutations in *bla*_{CTX-M} genes conferring resistance to BBLIs were usually associated with an antagonistic pleiotropy effect on cephalosporins; that is, resistance to these drugs was partial or completely abolished. The possibility of restoring CTX resistance was tested by serial passages of GB20 strains carrying each of the mutated CTX-Ms in the presence of increasing CTX concentrations and a fixed AMC concentration. Sampling for CTX-M genetic variants was performed at the highest concentrations of CTX enabling growth for each type of CTX-M evolution assay (see Materials and Methods). Forty bacterial GB20 strains carrying mutated CTX-Ms with the S130G change [eight each for CTX-M-1(S130G), CTX-M-3(S130G), CTX-M-10(S130G), CTX-M-9(S130G), and CTX-M-14(S130G)] were analyzed. Two types of variants were recovered. A type of mutant reverted to the wild-type genotype, G130S (33%), and a second variant carrying a double mutation (67%) was able to grow on a higher CTX concentration than its ancestral variant carrying the single S130G mutation. The restoration of cefotaxime resistance was the result of the change T515→C515, which confers the mutation L169S in the BBLI-resistant variant carrying the S130G mutation in CTX-M-10. The resultant phenotype pattern yielded slight increases in CTX (5.94-fold), CAZ (3.95-fold), and FEP (2-fold) MICs with respect to those of CTX-M-10(S130G). Although the AMC MIC

was unchanged, the TZP MIC decreased 5.3-fold, confirming again the antagonistic pleiotropy effect. In the case of the AMC-resistant mutant carrying the K234R mutation [CTX-M-14(K234R) variant], eight *in vitro* evolution experiments were performed. All mutant clones reverted to the wild-type genotype, R234K. Intragenic restoration of cefotaxime resistance by a second mutation was not detected in this case. Finally, in the eight parallel cultures of the AMC-resistant mutant carrying the S237G change [CTX-M-1(S237G) and CTX-M-3(S237G)], no additional changes were detected in the *bla*_{CTX-M-1}(S237G) or *bla*_{CTX-M-3}(S237G) genes.

DISCUSSION

Selection of IR-CTX-M variants in natural environments seems to be hindered by a number of constraints. First, despite the extended use of AMC and TZP in areas in which CTX-M enzymes are prevalent (14, 18, 53), IR-CTX-Ms have never been described in clinical isolates (6). Second, several widespread CTX-Ms, such as CTX-M-15, are frequently coselected in the same bacterial host with other β -lactamases, as those of the OXA type (10, 60), conferring variable degrees of resistance to BBLIs (32). Third, other mechanisms of BBLI resistance, such as porin loss (59) and hyperproduction of TEM-1 (29), might evolve in the exposed populations. Fourth, according to the experience with ESBL-TEM and ESBL-SHV β -lactamases, mutations leading to cephalosporin resistance and IR phenotypes tend to be mutually exclusive (antagonistic pleiotropy), suggesting negative trade-offs in catalytic efficiency (21).

Three types of IR-CTX-M mutations were detected in this work using the *in vitro* experiment model. The S130G mutation

has previously been described in clinical isolates with non-CTX-M β -lactamases, such as ESBL-SHV (SHV-10) (48), ESBL-TEM (TEM-59, TEM-76, and TEM-89; that is, IRT-17, IRT-20, and CMT-3, respectively) (3, 23, 34), and IRKO-1, an OXY-2-derivative (54). This mutation has also been obtained in laboratory conditions, as in IR-ROB-1 β -lactamases, selected in experimental evolution assays (16), and in the case of CTX-M-9(S130G), obtained by directed mutagenesis (1). In these cases, as well as in the IR-CTX-M variants described in this work, the S130G mutation provided a phenotype with reduced susceptibility to BBLIs (AMC and PTZ) and a simultaneous decrease in cephalosporin resistance (antagonistic pleiotropy effect). However, small differences were observed among variants belonging to different CTX-M families. Among β -lactamases belonging to the Ctx^r Caz^s group, the CTX-M-9 cluster showed a higher MIC to AMC than to TZP, while in the CTX-M-1 cluster, the behavior was the opposite. On the other hand, all variants derived from β -lactamases with a Ctx^r Caz^r group showed higher MICs to AMC than to TZP, except for CTX-M-58(S130G), belonging to the CTX-M-1 cluster.

The second mutation identified in this *in vitro* evolution experiment was K234R. This change has previously been identified in SHV β -lactamases, such as SHV-56, SHV-72, and SHV-84 (13, 27, 30), and reduces their affinity for clavulanic acid. However, in other types of β -lactamases, the effect of this change is not clear. In TEM-1, directed-mutagenesis experiments have demonstrated that this change has no effect on susceptibility to BBLI combinations (24). Moreover, arginine on position 234 is common in carbenicillin-hydrolyzing β -lactamases (CARB), which retain susceptibility to BBLIs (5). In agreement with previous reports on SHV (13), the IR-CTX-Ms carrying the K234R mutation found in our work have only a discrete or null effect against TZP. The third IR-CTX-M mutant carried the S237G change. Residue 237 also plays a role in inhibitor discrimination in CTX-M-4 (17) and KPC-2 β -lactamases (41). In both cases, when serine 237 was changed to alanine, a 2-fold increase in the AMC MIC was observed. In our study, the S237G change (not previously described in other β -lactamases) was found in two mutants belonging to the CTX-M-1 cluster but provided very low protection against AMC or TZP (2-fold). We did not find R276 substitutions in any of the IR-CTX-M variants obtained. This position in CTX-M enzymes was suggested to be a functional equivalent of R244 in TEM β -lactamases, which is involved in TEM inhibitor resistance (55). Our data support the results of recent work indicating that the replacement of arginine-276 with six other amino acids in CTX-M-1 was not associated with any change in β -lactamase inhibitor enzyme susceptibility (42).

According to EUCAST breakpoint recommendations, *in vitro*-obtained K234R and S237G mutants are not categorized as BBLI resistant and will presumably only be detected as such in association with other resistance mechanisms, such as porin loss. Only our variants with Ctx^r Caz^s β -lactamases belonging to the CTX-M-1 cluster carrying the S130G mutation were classified as BBLI resistant, in compliance with the current EUCAST breakpoint recommendations. None of our resistant variants would be categorized as resistant using CLSI recommendations. These problems of detection might have clinical consequences, particularly for strains carrying CTX-M-1 cluster enzymes that might evolve to resistance to TZP, the

BBLI combination most frequently used for systemic infections (39, 43).

A common characteristic of all IR-CTX-M variants was the mutual antagonism observed between the resistance phenotypes for BBLIs and cephalosporins. Nevertheless, in recent years, 11 ESBL-IR-TEM β -lactamases, called CMT (complex mutant TEM) variants, which retain activity on both cephalosporins and BBLIs, have been described in clinical isolates (6). Moreover, at least three clinical isolates with GES β -lactamases carrying G170S and E104K mutations and providing increased MICs to BBLIs and CTX simultaneously have been described (2, 22, 46). Interestingly, our results suggest that the restoration of the hydrolytic activity against cephalosporins by IR-CTX-M variants might be severely constrained. Among 64 evolution experiments, only one type of mutant, carrying a double mutation (S130G L169S) in CTX-M-10, was able to partially restore CTX and CAZ resistance. Mutations in the 169 position have been described in OXA-32 (L169I) as conferring an increased MIC to CAZ but not to CTX (46) and in a laboratory construction in a ROB-1 β -lactamase as conferring increased activity against both CTX and CAZ (16). The double S130G L169S mutant in CTX-M-10 increased by 5.94-fold the MIC to CTX but did not reach the threshold value to be considered a complex mutant CTX-M (CM-CTX-M). Only CTX-M-58(S130G) and CTX-M-58(K234R) variants carrying the P167S (conferring resistance to CAZ, 24 to 64 μ g/ml, respectively) and S130G and K234R changes (conferring resistance to BBLI, 8 to 12 μ g/ml) could be considered ESBL-IR-CTX-M or CM-CTX-M derivatives.

An interesting question is why natural IR-CTX-M variants have not been described in clinical isolates. The results of this work indicate that β -lactamases from all CTX-M clusters were able to acquire mutations involved in reducing the BBLI susceptibility upon exposure to BBLI, a risk which seems to be higher in the CTX-M-1 cluster. The pleiotropic hypothesis of niche evolution indicates that evolution toward CM-CTX-M is unlikely, as alleles increasing fitness during exposure to extended-spectrum cephalosporins will inevitably cause a regression of fitness when exposed to clavulanate and vice versa. However, double resistances might emerge as a consequence of the selection of compensatory mutations in the *bla*_{CTX-M} gene (26) or by coincidental acquisition by horizontal gene transfer of CTX-M enzymes and other β -lactamases providing inhibitor resistance, such as *bla*_{oxa-1} (14). Although we know that the coselection of several β -lactamases in the same clone could confer a complex phenotype of resistance to β -lactams, an attractive suggestion is that the concomitant use of cephalosporins and BBLIs might be considered as a possible preventive strategy to delay or obstruct the development of both cephalosporin resistance and BBLI resistance.

In agreement with other authors, we suspect that the phenotypic patterns shown by these IR-CTX-M or CM-CTX-M variants could be confused with common IR or ESBL β -lactamases (45), as their lack of detection might be more a methodological problem than a real absence in clinical strains. This work is an example of the type of research needed to elaborate predictions about the evolution of antibiotic resistance under antibiotic exposure and should eventually be followed by more scientifically based interventions to prevent the spread of antibiotic resistance (28).

ACKNOWLEDGMENTS

A. Ripoll is supported by a fellow research contract from the European Commission (PAR-241476). This project was funded by research grants from Ministerio de Sanidad y Consumo (Instituto de Salud Carlos III, FIS-PI-080624) and the European Community (PAR-241476 and TROCAR contract HEALTH-F3-2008-223031).

REFERENCES

- Aumeran, C., et al. 2003. Effects of Ser130Gly and Asp240Lys substitutions in extended-spectrum β -lactamase CTX-M-9. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2958–2961.
- Bae, I. K., et al. 2007. Genetic and biochemical characterization of GES-5, an extended-spectrum class A β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **58**:465–468.
- Bermudes, H., et al. 1999. Molecular characterization of TEM-59 (IRT-17), a novel inhibitor-resistant TEM-derived β -lactamase in a clinical isolate of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1657–1661.
- Bonnet, R., et al. 2001. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240→Gly. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2269–2275.
- Bush, K., and G. A. Jacoby. 2010. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:969–976.
- Cantón, R., M. I. Morosini, O. M. de la Maza, and E. G. de la Pedrosa. 2008. IRT and CMT β -lactamases and inhibitor resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**(Suppl. 1):53–62.
- Castanheira, M., H. S. Sader, and R. N. Jones. 2010. Antimicrobial susceptibility patterns of KPC-producing or CTX-M-producing *Enterobacteriaceae*. *Microb. Drug Resist.* **16**:61–65.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2010. Detection of *Enterobacteriaceae* isolates carrying metallo- β -lactamase—United States, 2010. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **59**:750.
- Coque, T. M., F. Baquero, and R. Cantón. 2008. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveill.* **13**:pii:19044.
- Coque, T. M., et al. 2008. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15. *Emerg. Infect. Dis.* **14**:195–200.
- Curiao, T., et al. 2010. Emergence of *bla*_{KPC-3}-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**:1608–1614.
- Díaz, M. A., et al. 2010. Diversity of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β -lactamases in Spain: second nationwide study. *J. Clin. Microbiol.* **48**:2840–2845.
- Dubois, V., et al. 2008. Molecular and biochemical characterization of SHV-56, a novel inhibitor-resistant β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:3792–3794.
- Dumartin, C., et al. 2010. Antibiotic use in 530 French hospitals: results from a surveillance network at hospital and ward levels in 2007. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**:2028–2036.
- Falagas, M. E., A. C. Kasteris, A. M. Kapaskelis, and D. E. Karageorgopoulos. 2010. Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum β -lactamase producing, *Enterobacteriaceae* infections: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* **10**:43–50.
- Galán, J. C., M. I. Morosini, M. R. Baquero, M. Reig, and F. Baquero. 2003. *Haemophilus influenzae bla*_(ROB-1) mutations in hypermutagenic delta-ampC *Escherichia coli* conferring resistance to cefotaxime and β -lactamase inhibitors and increased susceptibility to cefaclor. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2551–2557.
- Gazouli, M., E. Tzelepi, S. V. Sidorenko, and L. S. Tzouveleakis. 1998. Sequence of the gene encoding a plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase (CTX-M-4): involvement of serine 237 in cephalosporin hydrolysis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1259–1262.
- Goossens, H., M. Ferech, S. Coenen, and P. Stephens. 2007. Comparison of outpatient systemic antibacterial use in 2004 in the United States and 27 European countries. *Clin. Infect. Dis.* **44**:1091–1095.
- Hawkey, P. M., and A. M. Jones. 2009. The changing epidemiology of resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**:i3–i10.
- Jacoby, G. A., and L. S. Munoz-Price. 2005. The new β -lactamases. *N. Engl. J. Med.* **352**:380–391.
- Kalp, M., C. R. Bethel, R. A. Bonomo, and P. R. Carey. 2009. Why the extended-spectrum β -lactamases SHV-2 and SHV-5 are “hypersusceptible” to mechanism-based inhibitors. *Biochemistry* **48**:9912–9920.
- Kotsakis, S. D., et al. 2010. GES-13, a β -lactamase variant possessing Lys-104 and Asn-170 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:1331–1333.
- Leffon-Guibout, V., V. Speltooren, B. Heym, and M. Nicolas-Chanoine. 2000. Epidemiological survey of amoxicillin-clavulanate resistance and corresponding molecular mechanisms in *Escherichia coli* isolates in France: new genetic features of *bla*(TEM) genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2709–2714.
- Lenfant, F., et al. 1993. Site-directed mutagenesis of β -lactamase TEM-1. Investigating the potential role of specific residues on the activity of *Pseudomonas*-specific enzymes. *Eur. J. Biochem.* **217**:939–946.
- Livermore, D. M., et al. 2007. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**:165–174.
- MacLean, R. C., G. Bell, and P. B. Rainey. 2004. The evolution of a pleiotropic fitness tradeoff in *Pseudomonas fluorescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:8072–8077.
- Manageiro, V., E. Ferreira, L. Albuquerque, R. Bonnet, and M. Canica. 2010. Biochemical study of a new inhibitor-resistant β -lactamase, SHV-84, produced by a clinical *Escherichia coli* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:2271–2272.
- Martínez, J. L., F. Baquero, and D. I. Andersson. 2007. Predicting antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**:958–965.
- Martínez, J. L., et al. 1987. Resistance to β -lactam/clavulanate. *Lancet* **ii**:1473.
- Mendonça, N., et al. 2008. The Lys234Arg substitution in the enzyme SHV-72 is a determinant for resistance to clavulanic acid inhibition. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:1806–1811.
- Meyer, E., F. Schwab, B. Schroeren-Boersch, and P. Gastmeier. 2010. Dramatic increase of third-generation cephalosporin-resistant *E. coli* in German intensive care units: secular trends in antibiotic drug use and bacterial resistance, 2001 to 2008. *Crit. Care* **14**:R113.
- Naas, T., and P. Nordmann. 1999. OXA-type β -lactamases. *Curr. Pharm. Des.* **5**:865–879.
- Naseer, U., et al. 2009. Molecular characterization of CTX-M-15-producing clinical isolates of *Escherichia coli* reveals the spread of multidrug-resistant ST131 (O25:H4) and ST964 (O102:H6) strains in Norway. *APMIS* **117**:526–536.
- Neuwirth, C., et al. 2001. TEM-89 β -lactamase produced by a *Proteus mirabilis* clinical isolate: new complex mutant (CMT 3) with mutations in both TEM-59 (IRT-17) and TEM-3. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:3591–3594.
- Nguyen, N. T., et al. 2010. The sudden dominance of *bla*_{CTX-M} harbouring plasmids in *Shigella* spp. circulating in Southern Vietnam. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**:e702.
- Novais, A., et al. 2008. Mutational events in cefotaximase extended-spectrum β -lactamases of the CTX-M-1 cluster involved in ceftazidime resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:2377–2382.
- Novais, A., et al. 2010. Evolutionary trajectories of β -lactamase CTX-M-1 cluster enzymes: predicting antibiotic resistance. *PLoS Pathog.* **6**:e1000735.
- Oteo, J., et al. 2010. Parallel increase in community use of fosfomycin and resistance to fosfomycin in extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**:2459–2463.
- Oteo, J., M. Pérez-Vazquez, and J. Campos. 2010. Extended-spectrum [beta]-lactamase producing *Escherichia coli*: changing epidemiology and clinical impact. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **23**:320–326.
- Pakyz, A. L., M. Oinonen, and R. E. Polk. 2009. Relationship of carbapenem restriction in 22 university teaching hospitals to carbapenem use and carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:1983–1986.
- Papp-Wallace, K. M., et al. 2010. Substrate selectivity and a novel role in inhibitor discrimination by residue 237 in the KPC-2 β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:2867–2877.
- Pérez-Llarena, F. J., et al. 2008. Structure-function studies of arginine at position 276 in CTX-M β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**:792–797.
- Pitout, J. D. 2010. Infections with extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: changing epidemiology and drug treatment choices. *Drugs* **70**:313–333.
- Pitout, J. D., and K. B. Laupland. 2008. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect. Dis.* **8**:159–166.
- Pitout, J. D., P. Le, D. L. Church, D. B. Gregson, and K. B. Laupland. 2008. Antimicrobial susceptibility of well-characterized multiresistant CTX-M-producing *Escherichia coli*: failure of automated systems to detect resistance to piperacillin/tazobactam. *Int. J. Antimicrob. Agents* **32**:333–338.
- Poirer, L., G. F. Weldhagen, C. De Champs, and P. Nordmann. 2002. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum β -lactamase GES-2 in South Africa. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**:561–565.
- Pournaras, S., et al. 2009. Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**:348–352.
- Prinarakis, E. E., V. Miriagou, E. Tzelepi, M. Gazouli, and L. S. Tzouveleakis. 1997. Emergence of an inhibitor-resistant β -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:838–840.
- Qureshi, Z. A., et al. 2011. Risk factors and outcome of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* bloodstream infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* **37**:26–32.
- Rodríguez-Baño, J., et al. 2008. Community infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Arch. Intern. Med.* **168**:1897–1902.

51. **Rodríguez-Baño, J., et al.** 2006. Bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the CTX-M era: a new clinical challenge. *Clin. Infect. Dis.* **43**:1407–1414.
52. **Rodríguez-Baño, J., et al.** 2010. Community-onset bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: risk factors and prognosis. *Clin. Infect. Dis.* **50**:40–48.
53. **Rodríguez-Villalobos, H., et al.** 2011. Trends in production of extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* of clinical interest: results of a nationwide survey in Belgian hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**:37–47.
54. **Siro, D., et al.** 1998. Inhibitor-resistant OXY-2-derived β -lactamase produced by *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2184–2187.
55. **Stapleton, P. D., K. P. Shannon, and G. L. French.** 1999. Construction and characterization of mutants of the TEM-1 β -lactamase containing amino acid substitutions associated with both extended-spectrum resistance and resistance to β -lactamase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1881–1887.
56. **Tumbarello, M., et al.** 2008. Bloodstream infections caused by extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli*: risk factors for inadequate initial antimicrobial therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:3244–3252.
57. **Tumbarello, M., et al.** 2010. Costs of bloodstream infections caused by *Escherichia coli* and influence of extended-spectrum- β -lactamase production and inadequate initial antibiotic therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:4085–4091.
58. **Wachino, J., K. Yamane, S. Suzuki, K. Kimura, and Y. Arakawa.** 2010. Prevalence of fosfomycin resistance among CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Japan and identification of novel plasmid-mediated fosfomycin-modifying enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:3061–3064.
59. **Wang, X. D., J. C. Cai, H. W. Zhou, R. Zhang, and G. X. Chen.** 2009. Reduced susceptibility to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates associated with plasmid-mediated beta-lactamase production and OmpK36 porin deficiency. *J. Med. Microbiol.* **58**:1196–1202.
60. **Woodford, N., et al.** 2009. Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:4472–4482.
61. **Yong, D., et al.** 2009. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:5046–5054.

Detection of Resistance to Beta-Lactamase Inhibitors in Strains with CTX-M beta-Lactamases: a Multicenter Quality Control Assessment Using a Well-Defined Collection of *Escherichia coli* Strains

Aida Ripoll¹, Galán JC^{1,2*}, Cristina Rodríguez³, Nuria Tormo⁴, Concepción Gimeno⁴, Fernando Baquero^{1,2}, Luis Martínez-Martínez^{3,5,6}, Rafael Cantón^{1,6}, and SEIMC Quality Control Study Group

¹Servicio de Microbiología. Hospital Ramón y Cajal and Instituto de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain; ²CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP) Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ³Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IFIMAV, and ⁵Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander, Spain; ⁴Servicio de Microbiología, Hospital General de Valencia, Valencia, Spain; and ⁶Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

Corresponding author: Dr. Juan Carlos Galán (juancarlos.galan@salud.madrid.org)

Keywords: *Escherichia coli*, IR-CTX-M, CM-CTX-M, phenotype detection, β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations.

ABSTRACT

Quality control studies performed as proficiency exercises are useful for improving both antimicrobial susceptibility testing (AST) and the recognition of emerging resistance phenotypes. Through the Spanish Society for Infectious Diseases and Clinical Microbiology Quality Control program, 14 *Escherichia coli* strains masked as blood culture isolates were sent to 68 clinical microbiology laboratories for AST to β -lactams antibiotics, including β -lactams and β -lactam β -lactamase inhibitors combinations (BLBLIs). This collection included three control strains (ATCC-25922, IRT-2 producer and CMY-2 producer), six isogenic strains with/without OmpF and expressing ESBL-CTX-M β -lactamases (CTX-M-1, CTX-M-15 and CTX-M-14), one strain carrying a double mechanism of resistance (CTX-M-15 and OXA-1 enzymes), and four strains carrying CTX-M variants with different levels of resistance to BLBLIs. The reference MIC values were determined in two independent laboratories. CLSI criteria was used by 67.2% of the participants and EUCAST by 25.0%. The overall interpretative discrepancies rate was 11.5%, mainly associated with automatic/semiautomatic systems (61.9%), but also with manual clinical categorization when a resistance mechanism was inferred (38.1%). ESBL-CTX-M β -lactamase producing strains were correctly detected in 91.8% of cases; however, isogenic strains expressing CTX-M mutants with reduced susceptibility to BLBLIs and cephalosporins were mainly associated with ESBL production alone (51-80%) or in combination with other resistance mechanisms (14-31%), but not with *complex-mutant*-CTX-M phenotype. On the contrary, CTX-M variants with high resistance to BLBLIs were mainly identified as IRT enzymes (68.0%). Absence of recognition of these complex phenotypes might explain their apparent absence in the clinical setting, and could lead to inadequate treatment selection.

INTRODUCTION

β -lactamase production is the most important resistant mechanism to β -lactams antibiotics in Gram-negative bacteria (1). CTX-M extended spectrum β -lactamases (ESBLs) is becoming one of the larger groups of β -lactamases, with a spectacular increase in the number of variants detected along the last years (145 variants, last accession, July 24, 2013, www.lahey.org/Studies/other.asp). Isolates expressing these enzymes often confer resistance not only to oximino-cephalosporins but also to many other antimicrobial agents, thus representing an important problem in therapeutics and in Public Health (2-5).

CTX-M β -lactamases acquired capacity to hydrolyze ceftazidime due to single mutations and reduced susceptibility to carbapenems as a consequence of the impermeability of membrane. In CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates, resistance to β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations (BLBLI) has been associated with co-production of OXA-1 or with loss of expression of outer membrane proteins (2,16,17). However, CTX-M mutant enzymes with single aminoacid changes (as S130G, S237G and K234R) conferring reduced susceptibility or resistance to BLBLI combinations, have been easily obtained through *in vitro* conditions (18). Two classes of these mutant enzymes can be distinguished: i) *Inhibitor-Resistant*-CTX-M (IR-CTX-Ms), providing resistance to BLBLIs but at the expense of loss of resistance to cephalosporins (antagonistic pleiotropy); and ii) *Complex Mutant*-CTX-Ms (CM-CTX-Ms) conferring reduced susceptibility to BLBLIs and oximino-cephalosporins simultaneously.

The CTX-M variants with reduced susceptibility to BLBLI combinations have not yet been described in clinical settings, perhaps because the BLBLI combinations are not usually recommended as a therapeutic option in infections due to ESBL-producing strains. Carbapenems remain the main drugs of choice as empirical or oriented therapy for infections due to ESBL-producing organisms (6). Nevertheless, the increase in the consumption of this antibiotic class has been paralleled with the appearance and spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (7-13). Treatment of ESBL-strains with BLBLI combinations is still controversial, but now it seems that in infections

caused by ESBL-producing *E. coli*, the treatment with amoxicillin-clavulanate or piperacillin-tazobactam shows similar results to carbapenems; therefore these combinations can be administered as adequate therapy, preventing the overuse of carbapenems (14,15). The consumption of BLBLI combinations will probably increase the opportunity to select CTX-M variants with reduced susceptibility to these compounds.

Additionally, the absence of these variants in the clinical setting, could probably be related to the difficulties of recognizing typical phenotypes with conventional susceptibility-testing methods. Frequently, the phenotype associated with a new spectrum of activity in these CTX-M variants might prevent recognition of typical ESBL phenotypes. This makes us hypothesize that naturally occurring isolates harboring these IR- or CM-CTX-M variants might be undetected or misidentified in routine clinical laboratories, and are probably classified as strains harboring IRT β -lactamases (Inhibitor Resistant TEMs), CMT β -lactamases (Complex Mutant TEMs), or even as ESBL producers susceptible to BLBLI combinations. To document the difficulty in detecting IR- or CM-CTX-M variants, we performed a multicenter antimicrobial susceptibility testing study in Spain using a well characterized collection of *E. coli* strains showing a combination of transferable and mutational mechanisms affecting β -lactams, including BLBLI combinations. Laboratories were also requested to provide MICs and to infer the resistance mechanisms. Other questions such as use of CLSI or EUCAST breakpoints for categorization AST results were also analyzed.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. Fourteen *E. coli* strains including three different batches were studied: i) *E. coli* MKW505 strain and its isogenic MH621 OmpF⁻ variant (19,20) were transformed with pBGS18 (Kan^r) plasmid vector (21) harboring wild-type *bla*_{CTX-M} genes encoding CTX-M-1, CTX-M-15 and CTX-M-14 β -lactamases (corresponding to CCSRC01, -02; CCSRC05, -06 and CCSRC09, -10 respectively); ii) *E. coli* MH621 harboring a pBGS18 plasmid encoding *bla*_{CTX-M} genes expressing CTX-M enzymes with reduced susceptibility or resistance to BLBLIs (18) [CTX-M-1_{S130G}, CTX-M-

1_{S237G}, CTX-M-15_{S130G}, and CTX-M-14_{K234R} (corresponding to CCSRC03, -04, -07 and -11, respectively)]. In addition, *E. coli* MH621 simultaneously expressing CTX-M-15 plus OXA-1 β -lactamases (CCSRC08) was also included in the collection, as well as iii) three internal control strains (CCSRC12 to CCSRC14) expressing well established phenotypes: the susceptible *E. coli* ATCC 25922, strain recommended for AST quality control by the CLSI; a clinical *E. coli* strain with an IRT-2 β -lactamase (22); and a clinical *E. coli* strain expressing a CMY-2 β -lactamase, an AmpC plasmid-mediated β -lactamase (23).

Antibiotic susceptibility testing was performed in duplicate by two reference Microbiology laboratories, at Ramón y Cajal University Hospital (Madrid, Spain) and Marqués de Valdecilla University Hospital (Santander, Spain), by using both standard disk diffusion, a diffusion gradient test (Etest, BioMerieux, France), and broth microdilution methods according to CLSI guidelines (24, 25). MIC values for all strains were coincident in both laboratories (a few numbers of discrepancies were solved after replication of tests in both centers). Strains were categorized as susceptible, intermediate and resistant by using both the CLSI and EUCAST criteria [(26), http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/]. Fifteen β -lactam antibiotics were evaluated: ampicillin (AMP), amoxicillin-clavulanate (AMC), ticarcillin (TIC), piperacillin-tazobactam (TZP), cephalothin (CEF), cefazolin (CFZ), cefuroxime (CXM), cefoxitin (FOX), ceftazidime (CAZ), cefotaxime (CTX), cefepime (FEP), aztreonam (ATM), imipenem (IPM), meropenem (MEM) and ertapenem (ETP). Table 1 includes a description of genotypes and resistance profiles of all these strains.

Study design. The study was designed as a nationwide proficiency study, under the scientific auspices of the SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) External Quality Control Program. In October 2012, the 14 strains were sent to all participant laboratories masked as blood culture isolates. For this purpose, isolates were inoculated onto nutrient agar swabs, and distributed to 68 participating clinical microbiology laboratories in public hospitals in Spain. Before the shipment to participant laboratories, all genotypes (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{IRT-2} and *bla*_{CMY-2} genes) were confirmed with PCR and sequencing. Swabs were labeled with a number

(CCSRC01 to CCSRC14) and the bacterial species name (*E. coli*). Before the inoculation onto the swabs, strains CCSRC01 to CCSRC11 were selected on Luria Bertani agar (LB) supplemented with 50 µg/ml of kanamycin in order to ensure the presence of the pBGS18 plasmids harboring the CTX-M β-lactamases. Instructions to the participating laboratories indicated that the strains should be studied for susceptibility testing by the routine method in each laboratory. The participants were requested to complete an electronic form for each strain, including: i) the routine tests for susceptibility testing (i.e. type of automatic/semiautomatic system, or manual methods) ii) the quantitative susceptibility results (inhibition zone diameters or MIC values); iii) the breakpoint criteria used (CLSI, EUCAST, or other); iv) the clinical categorization (susceptible, intermediate or resistant) that would be reported to the clinicians; v) any additional test used to modify the clinical category or to confirm the obtained AST phenotype, vi) the inferred antibiotic resistance mechanism and vii) a recommendation for treatment, when considered adequate, according to every laboratory policy.

Evaluation of the results. Discrepancies between AST results and reference values were classified in very major (VME), major (ME) and minor (mE) errors (27). VME occurred when the results obtained by the participants were in the susceptible category, whereas the reference value was assigned in the resistance category (false-susceptible result). Conversely, ME was considered when the results obtained by the participant were in the resistant category, whereas they were in the susceptible category with the reference procedure (false-resistant result). Finally, mE occurred when the results obtained by the participant were susceptible or resistant and intermediate by the reference laboratories, or when the results obtained by the participant were intermediate and susceptible or resistant by the reference laboratories. Also, the modification of clinical categories that might be reported to the clinicians when a resistance mechanism was identified was considered. Error calculations were performed for each laboratory according to the breakpoint used, CLSI or EUCAST.

RESULTS

Participation rates, susceptibility testing methods and breakpoints. Sixty-eight clinical microbiology laboratories from different regions of Spain agreed to take part in this study, but only 64 (94.1%) finally provided the results. Automatic or semiautomatic systems were used by 62/64 centers; among them, 10 centers reported data using ≥ 2 systems (16.1%), 12 laboratories (19.3%) used one automatic system in combination with a manual method, and only 2 centers (3.1%) used exclusively manual methods for susceptibility testing. Therefore, the total number of results received using different automatic systems was 77 among 64 participant laboratories. When considering all the different values obtained from automatic systems ($n=77$), MicroScan WalkAway (Dade MicroScan Inc., West Sacramento, CA, USA) was the most extended equipment [37/77, (48.0%)], followed by Vitek2 [BioMérieux, Inc, Durham NC, US, 20/77, (26.0%)], Wider [(Fco Soria Melguizo, Madrid, Spain, 14/77 (18.1%)], and Phoenix [BD Biosciences, Sparks, MD, US, 6/77 (7.8%)]. Sixty centers reported results for all 14 strains whereas 3 centers reported information for 13 strains and one center reported only one strain. Although good compliance with the requested information was frequent, the number of reported antibiotics for each strain was not always uniform.

Many centers performed complementary tests to infer resistance phenotypes (i.e. ESBL production) or to confirm susceptibility values and specified this information in the comments for each strain: 51.6% (33/64) of the centers performed disk diffusion method and 18.8% (12/64) used a gradient test (in all cases Etest strips).

CLSI interpretive criteria was used in most laboratories (43/64, 67.2%), EUCAST criteria was used in 25.0% (16/64) of the centers, 6.2% (4/64) combined both CLSI and EUCAST criteria, and one center (1.6%) used other criteria (28).

Proficiency results in susceptibility testing. The reference MIC values obtained by broth microdilution assay and interpretative categories after applying the CLSI and EUCAST breakpoints are shown in table 1. When comparing reference values with data from the participants, the overall interpretative discrepancies rate was 11.5% (1,233 discrepancies out of 10,689 antimicrobials/strains/centers combinations tested with

categorical errors ranging from 3.0% to 9.8% for VMEs and ME respectively (table 2). The highest percentages of VMEs (false susceptibility) were observed for TZP (7.1%), CXM (7.1%) and AMC (6.5%). Contrary to VME, higher categorical MEs (false resistance) were observed, being FEP (29.1%), CAZ (28.5%) and TZP (25.4%) the most affected.

Table 3 shows, the types of errors depending on the automatic/semiautomatic/manual methods used or manual modifications. Globally, the method used was responsible for 61.9% (724/1169) of all the detected errors, whereas errors as a consequence of manual modifications in the clinical categories reached 38.1% (445/1169). These errors, based in an inadequate interpretation of the resistance mechanism, involved 80% of all participants and were mainly observed in false resistance category (ME, 73.5%). On the other hand, the error rates detected among the systems used were proportional to their frequency of use, MicroScan WalkAway being the system with the highest number of discrepancies in all categories. Regarding the breakpoint-derived discrepancies, the antibiotics mostly affected in the case of mEs were TZP and FEP. These mEs were produced as a consequence of modifications performed by clinical microbiologists when the resistance mechanisms were inferred. These modifications were performed irrespective of the interpretive criteria used (CLSI or EUCAST). Among false resistance (ME), the most affected strains were those expressing CTX-M-15, CTX-M-14 and CTX-M-14_{K234R} in OmpF⁻ background (CCSR06, -10, -11) for BLBLI combinations and CTX-M-1 and previously described strains in oxymino-cephalosporins (see table S1 of categorical errors for antibiotic and strain in supplementary material). Moreover the VME mainly affected strains expressing CTX-M-15 and CTX-M-15+OXA-1 in OmpF⁻ background (CCSR06 and CCSR08 respectively).

Table 4 shows the distribution of error rates by strains according to CLSI or EUCAST breakpoints. Centers using CLSI criteria showed slightly higher error rates (11.8%) than centers following EUCAST criteria (10.6%), mainly due to mEs (6.5% and 3.3%, respectively). However, VMEs were proportionally more frequent in centers

using EUCAST criteria (0.7% *versus* 3.0% in centers using CLSI and EUCAST, respectively).

Ability of the centers to infer the resistance mechanisms. Results for the control strains were as follows: i) ATCC 25922 *E. coli* strain (CCSRC12) was recognized as related with a susceptible phenotype in all cases (100%); ii) plasmid AmpC producer strain (CCSRC14) was correctly identified in 90.5% (57/63 of the centers), while 7.9% (5/63) inferred the simultaneous presence of a chromosomal AmpC β -lactamase and ESBL, and one center did not suggest any resistance mechanism although the strain was resistant to AMC, FOX, CTX and CAZ; iii) the strain carrying IRT-2 (CCSRC13) was correctly identified in 54.0% (34/63) of the laboratories, although 20.6% (13/63) suggested penicillinase hyper-production and finally other centers, representing 25.4% (16/63), did not report about possible resistance mechanisms. Figure 1 reflects the resistance mechanisms reported by the participating centers.

Globally, wild-type CTX-M- β -lactamases producer strains (CCSRC01, -02; CCSRC05, -06; CCSRC09 and -10) were correctly detected in 91.8% (56/63, 60/62, 61/62, 57/59, 50/62, 51/57, respectively) of the centers reporting data. In 5.5% of these combinations, the presence of an ESBL was presumed to be associated with penicillinase hyper-production and/or membrane porin alteration. One center reported a CMT phenotype in the case of the CCSRC10 strain (*E. coli* OmpF⁻ expressing CTX-M-14). Additionally, wrong genotypes were indicated in six cases (1.6%) among all laboratories reporting data for each wild-type CTX-M producer strain, such as possible carbapenemase production in two cases, and an ESBL-negative strain in four cases. Less than 1% of laboratories did not include any comment on the resistance mechanism.

Different results were obtained in the four strains lacking OmpF porin and harboring variants of CTX-M β -lactamases with mutations involved in decreased susceptibility of BLBLI combinations. Strains with a pure inhibitor resistant phenotype (IR-CTX-M), corresponding to CTX-M β -lactamases carrying S130G mutation [CTX-M-1_{S130G} and CTX-M-15_{S130G} (CCSRC03 and CCSRC07, respectively)] were identified as inhibitor resistant β -lactamase producers (mostly IRT) in 67.7% (44/62 and 40/62, for CCSRC03 and -07 respectively) of the centers reporting data. Wrong phenotypes

were reported in 9.7% (six incorrect phenotypes in each strain) of these combinations, which on eleven occasions were attributed to ESBL phenotype and one center inferred CMT production in the CCSRC03 strain.

Strains with the complex-mutant phenotype (CM-CTX-M) included two types of mutants [CTX-M-1_{S237G} and CTX-M-14_{K234R}, (corresponding to CCSRC04 and CCSRC11 respectively)], with different effects on ESBL and BLBLI phenotypes. Significantly, none of the centers identified a CM-CTX-M phenotype despite in many cases the AMC and TZP MICs being in the resistance category; the ESBL-phenotype was the more commonly inferred. Strain harboring CTX-M-1_{S237G} was mostly identified as an ESBL producer (79.4%, 50/63). An association of an ESBL with other resistance mechanisms (such as chromosomal AmpC β -lactamase, penicillinase hyperproduction) was reported in 14.3% (9/63) of centers. A wrong phenotype was identified in 1.6% (1/63) of the centers and 4.8% (3/63) did not report any resistance mechanism. The strain harboring CTX-M-14_{K234R} was associated in 51.6% (32/62) of centers with an ESBL phenotype. In 30.6% (19/62), the ESBL production was suspected in combination with other resistance mechanisms (as in the previous cases). Wrong phenotypes were communicated seven times (in 5 cases a penicillinase was reported as the unique mechanism of resistance and in 2 cases the resistance phenotype was not detected). No comments were added about resistance mechanisms in 6.4% (4/62).

In the strain with a double enzymatic mechanism (ESBL phenotype as a consequence of harboring CTX-M-15 enzyme and BLBLI phenotype due to presence of OXA-1 enzyme) (CCSRC08 strain), an adequate identification was observed in only 27.0% (17 out of 63) of the centers, which reported an association of an ESBL with other resistance mechanisms (chromosomal AmpC β -lactamase, or penicillinase hyperproduction such as OXA or TEM). However, most of the times (73.0%, 46/63), an ESBL-producer was identified despite displaying resistance to AMC.

Recommendations for therapy. For CTX-M-ESBL producers (CCSRC01, -02, CCSRC05, -06, CCSRC09 and -10), most centers (46/64) did not include treatment recommendations. Among the laboratories suggesting therapeutic options, 7 centers recommended carbapenems as a unique therapy, 4 centers suggested a carbapenem or a

BLBLI, depending on the source of infection, bacterial inoculum and patient's clinical situation. However, one center discouraged treatment with BLBLI due to the absence of studies confirming its clinical utility and a warning of possible failure in non-urinary bacteraemia. In one case, independently of the interpretive criteria used and BLBLI MICs, these antibiotics were not included in the report. Other recommended therapeutic options were: intravenous fosfomycin, extended-spectrum cephalosporins, carbapenems or BLBLI combined with fluoroquinolones or aminoglycosides.

Only 13 centers recommended therapeutic options for strains with a pure inhibitor resistant phenotype [IR-CTX-M (CCSRC03 and CCSRC07) and IRT (CCSRC13)]: extended spectrum cephalosporins or carbapenems, and fluoroquinolone and gentamicin when non- β -lactams were recommended. For strains with a CM-CTX-M phenotype, due to the expression of one (CCSRC04 and CCSRC11) or two enzymes (CTX-M-15 plus OXA-1, corresponding to CCSRC08 strain), most centers reported the strains as ESBL producers and consequently, the treatment recommendation was the same as for ESBL producers (a carbapenem alone or in combination with other antibiotics). Finally, for the CMY-2 producing strain (CCSRC14), the few centers (n=7) that included treatment recommendations suggested FEP (n=4) or gave other options such as tigecycline (n=1), TZP (n=1) or a carbapenem (n=1).

DISCUSSION

The increasing complexity, spread and clinical implications of antimicrobial resistance mechanisms deserve expert knowledge and make antimicrobial susceptibility testing (AST) one of the most important tasks in clinical microbiology laboratories (29). In AST, quality control studies performed as proficiency exercises are useful for improving the detection of resistance mechanisms and consequently a rational use of antimicrobials. Motivation of this quality control exercise comes from a previous study, where CTX-M variants with resistance or reduced susceptibility to BLBLI combinations were readily obtained in *in vitro* conditions (18). It was demonstrated that single mutations in *bla*_{CTX-M} genes could give rise to CTX-M variants with IR-CTX-M (carrying S130G mutation) or CM-CTX-M phenotypes (carrying S237G or K234R

mutation), like other β -lactamase types such as IRTs (30, 31), IR-SHV [Inhibitor Resistant SHV, (32-35)], IRKO-1 and OXY-2-derivatives (36). However, IR-CTX-M or CM-CTX-M enzymes have not been detected in the clinical setting or have not yet emerged. The absence of selection of these CTX-M variants in the nature could have been due to co-existence of several mechanisms conferring BLBLI resistance, such as: i) simultaneous presence of CTX-M enzymes and loss of porin channels, easily selectable in natural conditions (16); ii) association between CTX-M β -lactamases and other enzymatic mechanism of BLBLI resistance such as CTX-M-15 and OXA-1 (2,37), and iii) other mechanisms that might evolve in the exposed populations to BLBLI, such as hyper-production of AmpC-type β -lactamases (17). Lack of detection of these CTX-M variants in the clinical setting does not necessarily mean their real absence, because of the predominant interpretation of similar phenotypes attributed to IRTs and IR-SHVs (38). Of course complex effects, such as antagonistic pleiotropy, produce unexpected phenotypes in which the possible mechanism(s) of resistance are difficult to infer. For this reason the antagonistic pleiotropy observed in IR-CTX-M enzymes might mimic phenotypes involving inhibitor-resistant (IRTs/OXAs, IR-SHV or hyper-production of penicillinases) (17,39,40) or even inhibitor-susceptible β -lactamases (ESBL). It is of note that in some national surveillance programs nearly 5% of AMC-resistant *E. coli* isolates had unknown resistance mechanisms (41).

In our quality control study, variable percentages of laboratories deduced the presence of an ESBL in strains harboring CTX-M_{S130G}, CTX-M_{K234R} and CTX-M_{S237G}, (8.9%, 51.6%, and 79.4%, respectively), in spite of their reduced susceptibility to BLBLIs. A combination of an ESBL with other resistance mechanism was attributed to justify the resistance against BLBLI combinations in CTX-M_{K234R} and CTX-M_{S237G}-producing strains (30.7% and 14.3%, respectively). CTX-M_{S130G}-producing strains (showing the strongest antagonistic pleiotropy effect) were identified by 67.7% of laboratories as inhibitor-resistant-penicillinase producers, mainly as IRTs. Surprisingly, complex mutant phenotype (CM-type) was only suspected in strains carrying natural CTX-M-14 (CCSRC10) in an OmpF⁻ background.

Previously CLSI or national breakpoints (28) were followed in Spain, but currently EUCAST criteria are increasingly being introduced [24% in our study, compared with 14% in a recent published study (42), and 0% in previous ones (43,44)]. Globally, error rates were slightly higher in centers using CLSI criteria (11.8%) than in centers following EUCAST criteria (10.3%), except for the case of VMEs (3.0% of discrepancies when using EUCAST compared to 0.7% in centers that used CLSI). As explained in the results section, not all discrepancies were breakpoint-derived; VMEs showed by centers using EUCAST criteria and related with specific antibiotic/strains combinations were due to different AST results obtained with both automatic/semiautomatic systems and manual techniques.

It is noteworthy that strains classified as “susceptible” and “intermediate” by the manual or automatic testing procedures were modified by microbiologists to the “resistant” category in 80% of the laboratories when a specific resistance mechanism was inferred, representing 38.1% of all categorical errors for the most affected antibiotics (Table 3). Years ago, the modification of the interpretive categories was recommended when ESBL were detected on the assumption that breakpoints were inadequate (45). With the new CLSI and EUCAST criteria for *Enterobacteriaceae* [(26), http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/], extended spectrum cephalosporins should be reported as found, and considered as a valid therapeutic option when interpreted as susceptible, thus preventing the overuse of carbapenems. In addition, this recommendation allows the detection of resistance without the necessity of delays in reporting AST results when performing confirmatory tests (45). In our study, carbapenems were recommended by most centers for the treatment of ESBL-producing strains and only two laboratories recommended extended spectrum cephalosporins, which might reflect strict adherence to CLSI or EUCAST recommendations of reporting as tested. Depending on the source of infection, bacterial inoculum and patient’s clinical situation, BLBLI combinations were recommended, even in CTX-M variants producers conferring reduced susceptibility to BLBLIs. This is of particular concern, as resistance against these combinations was not taken into account.

On the contrary and according to CLSI and EUCAST breakpoints, the use of TZP could be considered as a therapeutic option in isolates producing CM-CTX-M enzymes (CTX-M_{K234R} and CTX-M_{S237G}) but not AMC (see reference MIC values in table 1). This is in agreement with *in vitro* and *in vivo* studies and recent clinical data analysis (14,15,46). In any case, an important factor is to report resistance or decreased susceptibility to BLBLI combinations when obtained in the laboratory, although the genotype and the corresponding resistance mechanism is not entirely recognized (14). This problem was also found for the CTX-M-15 plus OXA-1-producing strain, which was identified as an ESBL producer in 73.2% of the laboratories despite resistance to AMC and TZP.

In summary, the mechanisms explaining phenotypes associated with CTX-M β -lactamase variants (IR-CTX-Ms or CM-CTX-Ms) conferring decreased susceptibility to BLBLI combinations are widely unrecognized, and frequently misidentified as caused by ESBLs and to a lesser extent as IRT. Total or partial superposition of all these phenotypes could be in part responsible for the absence of recognition of these CTX-M variants in the clinical setting. Additionally, the frequent fact that the laboratories do not report resistance to BLBLI combinations when found in ESBL producers could lead to a reduction in the number of isolates detected and consequently reported. Further studies to improve detection of phenotypes resulting from IR-CTX-M and CT-CTX-M variant enzymes are needed, as our study demonstrates. Moreover, the majority (80%) of microbiology laboratories followed criteria not currently recommended by either CLSI and EUCAST committees. The application of these classic criteria might lead to a reduction in therapeutic options with an overuse of certain antibiotics, such as carbapenems, and eventually contribute to the selection of carbapenemases (18) and even to the evolution of novel mechanisms of resistance. We propose that recognition of possible emergent mechanisms (as IR- and CM-CTX-M enzymes) should be immediately followed by exercises of detection in the clinical laboratories, as the one carried out in this work, in order to assure rapid interventions before its emergence could be converted in uncontrollable spread.

Acknowledgments

We are grateful to the 64 participating centers and the SEIMC Quality Control Program for their contribution to making this work possible. The complete list of collaborators from these participating hospitals is as follows: Federico García (Hospital Universitario San Cecilio), Encarnación Ramírez de Arellano Ramos (Hospital Universitario Virgen de la Macarena, Sevilla), Carmen Florez Alia (Hospital Universitario de Valme, Sevilla), Josepa Tapiol Oliva (Hospital Universitario Joan XXIII, Tarragona), Sonia de Miguel (Hospital Universitario Santa Cristina, Madrid), Isabel Álamo Antunez (Hospital General Dr. Negrín, Las Palmas), Natalia Montiel Quezel-Guerraz (Hospital Costa del Sol, Marbella), Pilar Egido Lizán (Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza), M^a Dolores Miguel Martínez (Hospital de Cabueñes, Gijón), Fernando Chaves Sánchez (Hospital Doce de Octubre, Madrid), Jorge Calvo Montes (Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander), Inés de Benito Población (Hospital Sierrallana, Torrelavega, Cantabria), Susana García de Cruz (Complejo Hospitalario Santa Barbara, Soria), María Inmaculada García García (Hospital Clínico Universitario, Salamanca), Raúl Ortiz de Lejarazu (Hospital Clínico Universitario, Valladolid), Pilar Pérez Pascual (Hospital Universitario Río Hortega, Valladolid), Rosario Ibáñez (Complejo Asistencial, Ávila), Eva Riquelme Bravo (Hospital General Universitario, Albacete), M^a Dolores Romero Aguilera (Hospital General Ciudad Real), Susana Brea Zubigaray (Hospital Virgen de la Salud, Toledo), Rogelio Martín Álvarez (Hospital Universitario Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona), Jordi de Batlle Surroca (Hospital Universitario Gerona Dr. Josep Trueta, Gerona), Jordi Vila Estapé (Hospital Clínic, Barcelona), Ricardo Fernández Roblas (Fundación Jiménez Díaz, Madrid), Lucía Martínez Lamas (Complejo Hospitalario Xeral-Cies, Vigo), Rosa Villanueva González (Complejo Hospitalario Universitario A Coruña), David Molina Arana y Paloma García Hierro (Hospital Universitario Getafe, Madrid), María José González Abad (Hospital Infantil Niño Jesús, Madrid), Manuel López-Brea Calvo (Hospital la Princesa, Madrid), Carlos Sánchez (Hospital General U. Gregorio Marañón, Madrid), Ana Arribi Vilela (Hospital Clínico Universitario San Carlos, Madrid), Francisca Portero (Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid), Ana María

Enriquez Crego (Hospital Carlos III, Madrid), Felicitas Elena Calvo Muro (Hospital de Txagorritxu, Vitoria), José Luis Hernández Almaraz (Hospital de Cruces, Bilbao), M^a Jose López de Goicoechea San Román (Hospital de Galdakao, Bilbao), Nuria Tormo Consorcio (Hospital General de Valencia), José Luis López Hontangas (Hospital Universitario La Fe, Valencia), José Miguel Nogueira Coito (Hospital Universitario Dr. Peset, Valencia), Gloria Royo García (Hospital General Universitario de Elche, Alicante), Cristina Seral (Hospital Clínico Universitario, Zaragoza), Manuel A. Rodríguez Iglesias (Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz), Oscar Díez Gil (Hospital N^a Sra de la Candelaria, Santa Cruz de Tenerife), Isabel Wilhelm de Cal (Hospital Severo Ochoa, Madrid), Patricia Álvarez García (Complejo Hospitalario de Pontevedra), Juan García de Lomas Barrionuevo (Hospital Clínico Universitario de Valencia), Xavier Raga Luria (Hospital Sant Pau i Santa Tecla, Tarragona), M^a Dolores Rojo Martín (Hospital Virgen de las Nieves, Granada), M. Isabel Fernández Natal (Complejo Asistencial Universitario León - Sacyl, León), Avelino Gutiérrez Altés (Hospital Universitario La Paz, Madrid), Antonio Oliver (Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca), Marisa Morosini Reilly (Hospital Ramón y Cajal, Madrid), Antonio Manuel Martín Sánchez (Hospital Universitario Insular de Gran Canaria), Ana Sánchez-Maroto Lozano (Hospital Virgen de Altagracia, Ciudad Real), Carmen Gallegos Álvarez (Hospital Son Llatzer, Palma de Mallorca), M^a Dolores López Prieto (Hospital de Jerez), Javier Colomina Rodríguez (Hospital de la Ribera, Valencia), María Dolores Quesada (Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona), Almudena Alhambra Mosquera (Hospital de Madrid Norte-Sanchinarro, Madrid), Isabel Gasser Laguna (Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona), Genoveva Yagüe Guirao (Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, El palmar, Murcia), Ramón Cisterna Cáncer (Hospital de Basurto, Bilbao), Antonio Altuna Cuesta (Hospital General Reina Sofia, Madrid), Javier Aznar Martín (Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla).

Funding

Aida Ripoll was supported by the European Commission funded project PAR, HEALTH-2009-241476. The content and scientific background of this work was supported through a research grant from the European Commission (project PAR, HEALTH-2009-241476) and from

Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III, Spain (PI08/0624, PI12/00567, PI08/0397 and PI11/01117) and co-financed by European Development Regional Fund "A way to achieve Europe" ERDF, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015).

REFERENCES

1. **Jacoby GA and Munoz-Price LS.** 2005. The new beta-lactamases. *N Engl J Med.* **352**:380-391.
2. **Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, Baquero F, Cantón R, Nordmann P.** 2008. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis.* **14**:195-200.
3. **Livermore DM, Cantón R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N.** 2007. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* **59**:165-174.
4. **Naseer U, Haldorsen B, Tofteland S, Hegstad K, Scheutz F, Simonsen GS, Sundsfjord A.** 2009. Molecular characterization of CTX-M-15-producing clinical isolates of *Escherichia coli* reveals the spread of multidrug-resistant ST131 (O25:H4) and ST964 (O102:H6) strains in Norway. *APMIS.* **117**:526-536.
5. **Pitout JD and Laupland KB.** 2008. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.* **8**:159-166.
6. **Pitout JD.** 2010. Infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: changing epidemiology and drug treatment choices. *Drugs.* **70**:313-333.
7. **Centers for Disease Control and Prevention.** 2010. Detection of *Enterobacteriaceae* isolates carrying metallo-beta-lactamase - United States, 2010. *MMWR.* **59**:750-750.
8. **Curiao T, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, Robustillo A, Baquero F, Coque TM, Cantón R.** 2010. Emergence of bla KPC-3-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *J Antimicrob Chemother.* **65**:1608-1614.
9. **Meyer E, Schwab F, Schroeren-Boersch B, Gastmeier P.** 2010. Dramatic increase of third-generation cephalosporin-resistant *E. coli* in German intensive care units: secular trends in antibiotic drug use and bacterial resistance, 2001 to 2008. *Crit Care.* **14**:R113-
10. **Oteo J, Bautista V, Lara N, Cuevas O, Arroyo M, Fernández S, Lazaro E, de Abajo FJ, Campos J.** 2010. Parallel increase in community use of fosfomycin and

resistance to fosfomycin in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother. **65**:2459-2463.

11. **Wachino J, Yamane K, Suzuki S, Kimura K, Arakawa Y.** 2010. Prevalence of fosfomycin resistance among CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Japan and identification of novel plasmid-mediated fosfomycin-modifying enzymes. Antimicrob Agents Chemother. **54**:3061-3064.

12. **Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR.** 2009. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*_(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother. **53**:5046-5054.

13. **Cantón R, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Miriagou V, Naas T, Rossolini GM, Samuelsen O, Seifert H, Woodford N, Nordmann P.** 2012. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. Clin Microbiol Infect. **18**:413-431.

14. **Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Retamar P, Picon E, Pascual A.** 2012. beta-Lactam/beta-lactam inhibitor combinations for the treatment of bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: a post hoc analysis of prospective cohorts. Clin Infect Dis. **54**:167-174.

15. **Docobo-Pérez F, López-Cerero L, López-Rojas R, Egea P, Domínguez-Herrera J, Rodríguez-Baño J, Pascual A, Pachón J.** 2013. Inoculum effect on the efficacies of amoxicillin-clavulanate, piperacillin-tazobactam, and imipenem against extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing and non-ESBL-producing *Escherichia coli* in an experimental murine sepsis model. Antimicrob Agents Chemother. **57**:2109-2113.

16. **Cantón R, Morosini MI, de la Maza OM, de la Pedrosa EG.** 2008. IRT and CMT beta-lactamases and inhibitor resistance. Clin Microbiol Infect. **14 Suppl 1**:53-62.

17. **Ortega A, Oteo J, Ranzamendi-Zaldumbide M, Bartolomé RM, Bou G, Cercenado E, Conejo MC, González-López JJ, Marin M, Martínez-Martínez L, Merino M, Navarro F, Oliver A, Pascual A, Rivera A, Rodríguez-Baño J, Weber I, Aracil B, Campos J.** 2012. Spanish multicenter study of the epidemiology and mechanisms of amoxicillin-clavulanate resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. **56**:3576-3581.

18. **Ripoll A, Baquero F, Nováis A, Rodríguez-Domínguez MJ, Turrientes MC, Cantón R, Galán JC.** 2011. In vitro selection of variants resistant to beta-lactams plus

beta-lactamase inhibitors in CTX-M beta-lactamases: predicting the in vivo scenario? *Antimicrob Agents Chemother.* **55**:4530-4536.

19. **Sato M, Machida K, Arikado E, Saito H, Kakegawa T, Kobayashi H.** 2000. Expression of outer membrane proteins in *Escherichia coli* growing at acid pH. *Appl Environ Microbiol.* **66**:943-947.

20. **Ferrario M, Ernsting BR, Borst DW, Wiese DE, Blumenthal RM, Matthews RG.** 1995. The leucine-responsive regulatory protein of *Escherichia coli* negatively regulates transcription of *ompC* and *micF* and positively regulates translation of *ompF*. *J Bacteriol.* **177**:103-113.

21. **Spratt BG, Hedge PJ, te HS, Edelman A, Broome-Smith JK.** 1986. Kanamycin-resistant vectors that are analogues of plasmids pUC8, pUC9, pEMBL8 and pEMBL9. *Gene.* **41**:337-342.

22. **Martín O, Valverde A, Morosini MI, Rodríguez-Domínguez M, Rodríguez-Baños M, Coque TM, Cantón R, del CR.** 2010. Population analysis and epidemiological features of inhibitor-resistant-TEM-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from both community and hospital settings in Madrid, Spain. *J Clin Microbiol.* **48**:2368-2372.

23. **Miró E, Agüero J, Larrosa MN, Fernández A, Conejo MC, Bou G, González-López JJ, Lara N, Martínez-Martínez L, Oliver A, Aracil B, Oteo J, Pascual A, Rodríguez-Baño J, Zamorano L, Navarro F.** 2013. Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC beta-lactamases and carbapenemases in *Enterobacteriaceae* isolates from 35 hospitals in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **32**:253-259.

24. **Clinical and Laboratory Standard Institute.** 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, 8th edn. Document M07-A9. Wayne, PA. CLSI 2012.

25. **Clinical and Laboratory Standard Institute.** 2013. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved Standard, 8th edn. Document M02-A11. Wayne, PA, CLSI 2012.

26. **Clinical and Laboratory Standard Institute.** 2013. Performance and standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty third International Supplement. Document M-100-S23. Wayne, PA, CLSI 2013.

27. **Clark RLMLMTR.** 2009. Verification and validation of procedures in the clinical microbiology laboratory. Coordinating ed. Sharp SE. ASM Press, Washington, DC.

28. **Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos (MENSURA).** 2000. Recomendaciones del grupo Mensura para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad y criterios para la interpretación del antibiograma. *Rev Esp Quimioter.* **13**:73-86.
29. **Jorgensen JH and Ferraro MJ.** 2000. Antimicrobial susceptibility testing: special needs for fastidious organisms and difficult-to-detect resistance mechanisms. *Clin Infect Dis.* **30**:799-808.
30. **Bermudes H, Jude F, Chaibi EB, Arpin C, Bebear C, Labia R, Quentin C.** 1999. Molecular characterization of TEM-59 (IRT-17), a novel inhibitor-resistant TEM-derived beta-lactamase in a clinical isolate of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob Agents Chemother.* **43**:1657-1661.
31. **Leflon-Guibout V, Speldooren V, Heym B, Nicolas-Chanoine M.** 2000. Epidemiological survey of amoxicillin-clavulanate resistance and corresponding molecular mechanisms in *Escherichia coli* isolates in France: new genetic features of bla(TEM) genes. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**:2709-2714.
32. **Dubois V, Poirel L, Demarthe F, Arpin C, Coulange L, Minarini LA, Bezan MC, Nordmann P, Quentin C.** 2008. Molecular and biochemical characterization of SHV-56, a novel inhibitor-resistant beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**:3792-3794.
33. **Manageiro V, Ferreira E, Albuquerque L, Bonnet R, Canica M.** 2010. Biochemical study of a new inhibitor-resistant beta-lactamase, SHV-84, produced by a clinical *Escherichia coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**:2271-2272.
34. **Mendonca N, Manageiro V, Robin F, Salgado MJ, Ferreira E, Canica M, Bonnet R.** 2008. The Lys234Arg substitution in the enzyme SHV-72 is a determinant for resistance to clavulanic acid inhibition. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**:1806-1811.
35. **Prinarakis EE, Miriagou V, Tzelepi E, Gazouli M, Tzouvelekis LS.** 1997. Emergence of an inhibitor-resistant beta-lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob Agents Chemother.* **41**:838-840.
36. **Sirot D, Labia R, Pouedras P, Chanal-Claris C, Cerceau C, Sirot J.** 1998. Inhibitor-resistant OXY-2-derived beta-lactamase produced by *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob Agents Chemother.* **42**:2184-2187.
37. **Woodford N, Carattoli A, Karisik E, Underwood A, Ellington MJ, Livermore DM.** 2009. Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from

the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**:4472-4482.

38. **Pitout JD, Le P, Church DL, Gregson DB, Laupland KB.** 2008. Antimicrobial susceptibility of well-characterised multiresistant CTX-M-producing *Escherichia coli*: failure of automated systems to detect resistance to piperacillin/tazobactam. *Int J Antimicrob Agents.* **32**:333-338.

39. **Martínez JL, Cercenado E, Rodríguez-Creixems M, Vincente-Pérez MF, Delgado-Iribarren A, Baquero F.** 1987. Resistance to beta-lactam/clavulanate. *Lancet.* **2**:1473-

40. **Hanson ND and Sanders CC.** 1999. Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among *Enterobacteriaceae*. *Curr Pharm Des.* **5**:881-894.

41. **Kaye KS, Gold HS, Schwaber MJ, Venkataraman L, Qi Y, De Girolami PC, Samore MH, Anderson G, Rasheed JK, Tenover FC.** 2004. Variety of beta-lactamases produced by amoxicillin-clavulanate-resistant *Escherichia coli* isolated in the northeastern United States. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**:1520-1525.

42. **Juan C, Conejo MC, Tormo N, Gimeno C, Pascual A, Oliver A.** 2013. Challenges for accurate susceptibility testing, detection and interpretation of beta-lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa*: results from a Spanish multicentre study. *J Antimicrob Chemother.* **68**:619-630.

43. **Conejo MC, Mata C, Navarro F, Pascual A.** 2008. Detection and reporting beta-lactam resistance phenotypes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: a multicenter proficiency study in Spain. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **62**:317-325.

44. **Cantón R, Loza E, Del Carmen CM, Baquero F, Martínez-Martínez L.** 2003. Quality control for beta-lactam susceptibility testing with a well-defined collection of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* strains in Spain. *J Clin Microbiol.* **41**:1912-1918.

45. **Leclercq R, Cantón R, Brown DF, Giske CG, Heisig P, Macgowan AP, Mouton JW, Nordmann P, Rodloff AC, Rossolini GM, Soussy CJ, Steinbakk M, Winstanley TG, Kahlmeter G.** 2013. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect.* **19**:141-160.

46. **López-Cerero L, Picon E, Morillo C, Hernández JR, Docobo F, Pachón J, Rodríguez-Baño J, Pascual A.** 2010. Comparative assessment of inoculum effects on the antimicrobial activity of amoxycillin-clavulanate and piperacillin-tazobactam with extended-spectrum beta-lactamase-producing and extended-spectrum beta-lactamase-non-producing *Escherichia coli* isolates. *Clin Microbiol Infect.* **16**:132-136.

Table 1. MIC reference values and interpretative category according to CLSI and EUCAST criteria.

Code	Porin status/ β -lactamase	Phenotype according with genotype	AMP ^b	AMC ^c	TIC	TZP ^d	CEF ^e	CFZ ^e	CXM
CCSRC01	OmpF ⁺ /CTX-M-1	ESBL-CTX-M	>256 (R/R)	16 (I/R)	>256 (R/R)	2 (S/S)	>256 (R/-)	>256 (R/-)	>128 (R/R)
CCSRC02	OmpF ⁺ /CTX-M-1	ESBL-CTX-M	>256 (R/R)	32 (R/R)	>256 (R/R)	2 (S/S)	>256 (R/-)	>256 (R/-)	>128 (R/R)
CCSRC03	OmpF ⁻ /CTX-M-1 _{S130G}	IR-CTX-M	>256 (R/R)	128 (R/R)	>256 (R/R)	128 (R/R)	128 (R/-)	32 (R/-)	16 (I/R)
CCSRC04	OmpF ⁻ /CTX-M-1 _{S237G}	CM-CTX-M	>256 (R/R)	128 (R/R)	>256 (R/R)	2 (S/S)	>256 (R/-)	>256 (R/-)	>128 (R/R)
CCSRC05	OmpF ⁺ /CTX-M-15	ESBL-CTX-M	>256 (R/R)	8 (S/S)	>256 (R/R)	2 (S/S)	>256 (R/-)	>256 (R/-)	>128 (R/R)
CCSRC06	OmpF ⁻ /CTX-M-15	ESBL-CTX-M	>256 (R/R)	16 (I/R)	>256 (R/R)	4 (S/S)	>256 (R/-)	>256 (R/-)	>128 (R/R)
CCSRC07	OmpF ⁺ /CTX-M-15 _{S130G}	IR-CTX-M	>256 (R/R)	128 (R/R)	>256 (R/R)	64 (I/R)	64 (R/-)	32 (R/-)	16 (I/R)
CCSRC08	OmpF ⁻ /CTX-M-15 + OXA-1	CM-CTX-M	>256 (R/R)	128 (R/R)	>256 (R/R)	64 (I/R)	>256 (R/-)	256 (R/-)	>128 (R/R)
CCSRC09	OmpF ⁺ /CTX-M-14	ESBL-CTX-M	>256 (R/R)	32 (R/R)	>256 (R/R)	2 (S/S)	>256 (R/-)	>256 (R/-)	>128 (R/R)
CCSRC10	OmpF ⁻ /CTX-M-14	ESBL-CTX-M	>256 (R/R)	32 (R/R)	>256 (R/R)	4 (S/S)	>256 (R/-)	>256 (R/-)	>128 (R/R)
CCSRC11	OmpF ⁻ /CTX-M-14 _{K234R}	CM-CTX-M	>256 (R/R)	64 (R/R)	>256 (R/R)	2 (S/S)	>256 (R/-)	>256 (R/-)	64 (R/R)
CCSRC12	ATCC 25922	Wild type	4 (S/S)	4 (S/S)	4 (S/S)	2 (S/S)	8 (S/-)	2 (S/-)	4 (S/S)
CCSRC13	IRT-2	IRT	>256 (R/R)	32 (R/R)	>256 (R/R)	8 (S/S)	16 (I/-)	2 (S/-)	16 (I/R)
CCSRC14	CMY-2	Plasmid AmpC	>256 (R/R)	64 (R/R)	>256 (R/R)	8 (S/S)	>256 (R/-)	>256 (R/-)	128 (R/R)

Table 1. Continuation.

Code	FOX ^e	CTX	CAZ	ATM	FEP	IPM	MEM	ETP
CCSRC01	4 (S/-)	>256 (R/R)	4(S/I)	64 (R/R)	16 (I/R)	0.5 (S/S)	0.06 (S/S)	0.06 (S/S)
CCSRC02	8 (S/-)	>256 (R/R)	16 (R/R)	256 (R/R)	128 (R/R)	0.5 (S/S)	0.12 (S/S)	0.06 (S/S)
CCSRC03	8 (S/-)	0.125 (S/S)	1 (S/S)	0.5 (S/S)	0.25 (S/S)	0.5 (S/S)	≤0.03 (S/S)	≤0.03 (S/S)
CCSRC04	8 (S/-)	>256 (R/R)	16 (R/R)	256 (R/R)	32 (R/R)	0.5 (S/S)	≤0.03 (S/S)	0.125 (S/S)
CCSRC05	4 (S/-)	128 (R/R)	4 (S/I)	16 (R/R)	4 (S/S)	0.5 (S/S)	≤0.03 (S/S)	≤0.03 (S/S)
CCSRC06	8 (S/-)	256 (R/R)	16 (R/R)	32 (R/R)	32 (R/R)	0.5 (S/S)	0.06 (S/S)	0.125 (S/S)
CCSRC07	8 (S/-)	0.125 (S/S)	1 (S/S)	1 (S/S)	0.25 (S/S)	0.5 (S/S)	0.06 (S/S)	≤0.03 (S/S)
CCSRC08	8 (S/-)	128 (R/R)	32 (R/R)	64 (R/R)	32 (R/R)	0.5 (S/S)	≤0.03 (S/S)	0.125 (S/S)
CCSRC09	4 (S/-)	>256 (R/R)	4 (S/I)	16 (R/R)	32 (R/R)	0.5 (S/S)	≤0.03 (S/S)	≤0.03 (S/S)
CCSRC10	8 (S/-)	>256 (R/R)	16 (R/R)	128 (R/R)	256 (R/R)	0.5 (S/S)	≤0.03 (S/S)	0.5 (S/S)
CCSRC11	8 (S/-)	1 (S/S)	2 (S/I)	8 (R/R)	8 (S/R)	0.5 (S/S)	≤0.03 (S/S)	0.5 (S/S)
CCSRC12	4 (S/-)	0.06 (S/S)	0.25 (S/S)	0.25 (S/S)	≤0.01 (S/S)	0.25 (S/S)	≤0.03 (S/S)	≤0.03 (S/S)
CCSRC13	4 (S/-)	0.25 (S/S)	0.25 (S/S)	≤0.01 (S/S)	1 (S/S)	0.12 (S/S)	≤0.03 (S/S)	≤0.03 (S/S)
CCSRC14	> 128 (R/-)	16 (R/R)	32 (R/R)	8 (I/R)	1 (S/S)	0.25 (S/S)	0.06 (S/S)	0.5 (S/S)

^a The CLSI and EUCAST categories were obtained from reference 26 and (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/) respectively. ^b The nomenclature of the antibiotics is described in the text. ^cAMC (amoxicillin-clavulanate, 2:1 concentration), ^d TZP (piperacillin-tazobactam, 4µg/ml of tazobactam). In brackets clinical show category by CLSI/EUCAST. ^e Absence of EUCAST criteria.

Table 2. Distributions of categorical error rates by antimicrobial agent tested and interpretive criteria (CLSI or EUCAST).

Antibiotic ^a	Criteria	Organism/antibiotic combination tested	Number of strains		Discrepancies in interpretative category		Type of Errors					
			S	R	n	%	mE		ME		VME	
							n	% ^b	n	% ^c	n	% ^d
AMP	CLSI	540	39	501	1	0.2	0	0	0	0	1	0.2
	EUCAST	260	19	241	1	0.4	1	0.4	0	0	0	0
AMC	CLSI	603	72	408	175	29	154	25.5	6	8.3	15	3.7
	EUCAST	261	38	148	32	12.3	5	1.9	6	15.8	21	14.2
TIC	CLSI	111	6	102	3	2.7	1	0.9	0	0	2	2
	EUCAST	42	3	38	1	2.4	0	0	0	0	1	2.6
TZP	CLSI	576	363	38	151	26.2	86	14.9	65	17.9	0	0
	EUCAST	246	129	47	70	28.5	4	1.6	60	46.5	6	12.8
CEF ^g	CLSI	594	42	488	57	9.6	51	8.6	1	2.4	5	1
CFZ ^g	CLSI	479	398	62	19	4	10	2.1	6	1.5	3	4.8
CXM	CLSI	578	42	403	101	17.5	99	17.1	0	0	2	0.5
	EUCAST	261	19	200	44	16.9	3	1.1	0	0	41	20.5
FOX ^g	CLSI	836	678	61	97	11.6	8	1	89	13.1	0	0
CTX	CLSI	595	178	377	45	7.6	6	1	35	19.7	4	1.1
	EUCAST	259	69	166	19	7.3	3	1.2	15	21.7	1	0.6
CAZ	CLSI	598	243	237	118	19.7	21	3.5	93	38.3	4	1.7
	EUCAST	260	94	108	57	21.9	54	20.8	3	3.2	0	0
ATM	CLSI	483	139	298	39	8.1	25	5.2	7	5	7	2.3
	EUCAST	191	55	125	14	7.3	10	5.2	1	1.8	3	2.4
FEP	CLSI	600	228	233	140	23.3	58	9.7	70	30.7	12	5.2
	EUCAST	261	88	140	33	12.6	5	1.9	22	25	6	4.3
IPM	CLSI	599	595	0	4	0.7	3	0.5	1	0.2	NA ^e	NA ^e
	EUCAST	265	263	0	2	0.8	0	0	2	0.8	NA ^e	NA ^e
MEM	CLSI	266	266	0	0	0	0	0	0	0	NA ^e	NA ^e
	EUCAST	91	91	0	0	0	0	0	0	0	NA ^e	NA ^e
ETP	CLSI	570	569	0	1	0.2	0	0	1	0.2	NA ^e	NA ^e
	EUCAST	264	255	0	9	3.4	3	1.1	6	2.4	NA ^e	NA ^e
TOTAL ^f	CLSI	8028	3858	3208	951	11.8	522	6.5	374	9.7	55	1.7
	EUCAST	2661	1123	1213	282	10.6	88	3.3	115	10.2	79	6.5
TOTAL		10,689	4,981	4,421	1,233	11.5	610 ^f	5.7	489	9.8	134	3

^a The nomenclature of the antibiotics is described in the text. ^b Percentage mE was calculated considering the total number of susceptibility testing determinations for each antibiotic as the denominator. ^c Percentage ME was calculated considering the number of susceptible strains for each antibiotic as the denominator. ^d Percentage VME was determined using the number of resistant strains for each antibiotic as the denominator. ^e NA (not applicable). ^f Total number and percentages of discrepancies in centers using CLSI or EUCAST criteria. ^g Absence of EUCAST criteria.

Table 3. Most common antibiotic errors classified by categorical errors.

Type of Errors	Antibiotic ^a	N° of errors ^b	Errors due to automatic/semiautomatic systems and manual antimicrobial susceptibility testing						Manual changes ^c	Strains ^d
			MicroScan	Vitek	Wider	Phoenix	Manual	Total		
mE	AMC	159	75 (51.0)	43 (29.2)	16 (10.9)	10 (6.8)	3 (2.0)	147 (92.5)	12 (7.5)	CCSRC01, CCSRC05, CCSRC09
	TZP	92	37 (52.1)	18 (25.35)	6 (8.45)	5 (7.04)	5 (7.04)	71 (77.2)	21 (22.8)	CCSRC08 ^e , CCSRC07 ^e
	CEF	51	32 (62.7)	4 (7.8)	8 (15.7)	0 (0.0)	7 (13.7)	51 (100.0)	0 (0.0)	CCSRC03, CCSRC07, CCSRC13
	CXM	102	52 (52.5)	24 (24.2)	15 (15.2)	3 (3.0)	5 (5.1)	99 (97.1)	3 (2.9)	CCSRC03, CCSRC07, CCSRC13
	CAZ	75	21 (52.5)	14 (35.0)	2 (5.0)	0 (0.0)	3 (7.5)	40 (53.3)	35 (46.7)	CCSRC01, CCSRC05, CCSRC09, CCSRC11
	ATM	35	6 (31.6)	2 (10.5)	2 (10.5)	3 (15.8)	6 (31.6)	19 (54.29)	16 (45.7)	CCSRC13
	FEP	63	27 (47.4)	18 (31.6)	9 (15.8)	2 (3.5)	1 (1.7)	57 (90.5)	6 (9.5)	CCSRC01 ^e
	Total	577	250 (51.6)	123 (25.4)	58 (12.0)	23 (4.7)	30 (6.2)	484 (83.9)	93 (16.1)	
ME	AMC	12	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	12 (100)	CCSRC07
	TZP	125	11 (84.6)	2 (15.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	13 (10.4)	112 (89.6)	all TZP susceptible strains
	FOX	89	2 (50.0)	2 (50.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (4.5)	85 (95.5)	all strains but CCSRC12 and CCSRC14
	CTX	50	19 (57.6)	7 (21.2)	4 (12.1)	3 (9.1)	0 (0.0)	33 (66)	17 (34)	CCSRC11
	CAZ	96	11 (57.9)	2 (10.5)	5 (26.3)	0 (0.0)	1 (5.3)	19 (19.8)	77 (80.2)	CCSRC01, CCSRC09, CCSRC11
	ATM	8	0 (0.0)	1 (20.0)	1 (20.0)	2 (40.0)	1 (20.0)	5 (62.5)	3 (37.5)	CCSRC03, CCSRC07
	FEP	92	39 (76.5)	4 (7.8)	8 (15.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	51 (55.4)	41 (44.6)	CCSRC05, CCSRC11
	Total	472	82 (65.6)	18 (14.4)	18 (14.4)	5 (4.0)	2 (1.6)	125 (26.5)	347 (73.5)	
VME	AMC	36	15 (41.7)	17 (47.2)	4 (11.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	36 (100.0)	0 (0.0)	CCSRC06, CCSRC10
	TZP	6	3 (50.0)	0 (0.0)	3 (50.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (100.0)	0 (0.0)	CCSRC08
	CFZ	3	3 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (100.0)	0 (0.0)	CCSRC03, CCSRC09
	CXM	43	21 (50.0)	11 (26.2)	4 (9.5)	4 (9.5)	2 (4.8)	42 (97.8)	1 (2.3)	CCSRC03, CCSRC07, CCSRC13
	CAZ	4	0 (0.0)	3 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (75.0)	1 (25.0)	CCSRC10
	ATM	10	4 (44.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (22.2)	3 (33.3)	9 (90.0)	1 (10.0)	CCSRC11
	FEP	18	7 (43.8)	7 (43.8)	0 (0.0)	2 (12.5)	0 (0.0)	16 (88.9)	2 (11.1)	CCSRC11
	Total	120	53 (46.1)	38 (33.0)	11 (9.6)	8 (6.9)	5 (4.3)	115 (95.8)	5 (4.2)	
		1169	385 (53.2)	179 (24.7)	87 (12.0)	36 (5.0)	37 (5.1)	724 (61.9)	445 (38.1)	

^a Antibiotics more affected including both CLSI and EUCAST criteria; ^{b,c} total errors for each antibiotic within the corresponding categorical error (the number of errors are the result of automatic/manual AST errors and manual modifications by the reader of MIC following antibiotic resistance rules); ^c errors related with manual modification of clinical categories when resistance mechanisms were inferred; ^d strains more affected for each antibiotics and type of error; ^e antibiotic/strain combinations for which errors are due exclusively to CLSI interpretative criteria (see supplementary material).

Table 4. Distributions of categorical error rates by tested strain and interpretive criteria (CLSI or EUCAST).

Strains	Porin status/ β -lactamase	Criteria	N° data ^a	Total errors ^b		mE		ME		VME	
				<i>n</i>	%	<i>n</i>	% ^c	<i>n</i>	% ^c	<i>n</i>	% ^c
CCSRC01	OmpF ⁺ /CTX-M-1	CLSI	596	119	20.0	71	11.9	48	8.1	0	0.0
		EUCAST	199	28	14.1	18	9.0	7	3.5	3	1.5
CCSRC02	OmpF ⁻ /CTX-M-1	CLSI	572	47	8.2	34	5.9	13	2.3	0	0.0
		EUCAST	196	8	4.1	0	0.0	7	3.6	1	0.5
CCSRC03	OmpF ⁻ /CTX-M-1 _{S130G}	CLSI	578	78	13.5	51	8.8	21	3.6	6	1.0
		EUCAST	195	23	11.8	4	2.1	6	3.1	13	6.7
CCSRC04	OmpF ⁻ /CTX-M-1 _{S237G}	CLSI	588	29	4.9	11	1.9	17	2.9	1	0.2
		EUCAST	194	9	4.6	0	0.0	8	4.1	1	0.5
CCSRC05	OmpF ⁺ /CTX-M-15	CLSI	574	62	10.8	8	1.4	52	9.1	2	0.3
		EUCAST	194	45	23.2	19	9.8	26	13.4	0	0.0
CCSRC06	OmpF ⁻ /CTX-M-15	CLSI	543	58	10.7	42	7.7	13	2.4	3	0.6
		EUCAST	193	18	9.3	1	0.5	5	2.6	12	6.2
CCSRC07	OmpF ⁻ /CTX-M-15 _{S130G}	CLSI	572	88	15.4	77	13.5	10	1.7	1	0.2
		EUCAST	182	21	11.5	1	0.5	6	3.3	14	7.7
CCSRC08	OmpF ⁻ /CTX-M-15 + OXA-1	CLSI	586	65	11.1	47	8.0	11	1.9	7	1.2
		EUCAST	193	10	5.2	1	0.5	3	1.6	6	3.1
CCSRC09	OmpF ⁺ /CTX-M-14	CLSI	582	90	15.5	31	5.3	48	8.2	11	1.9
		EUCAST	183	24	13.1	16	8.7	6	3.3	2	1.1
CCSRC10	OmpF ⁻ /CTX-M-14	CLSI	528	53	10.0	28	5.3	13	2.5	12	2.3
		EUCAST	159	11	6.9	1	0.6	9	5.7	1	0.6
CCSRC11	OmpF ⁻ /CTX-M-14 _{K234R}	CLSI	559	129	23.1	23	4.1	99	17.7	7	1.3
		EUCAST	193	48	24.9	19	9.8	20	10.4	9	4.7
CCSRC12	ATCC 25922	CLSI	584	2	0.3	0	0.0	2	0.3	0	0.0
		EUCAST	192	2	1.0	1	0.5	1	0.5	0	0.0
CCSRC13	IRT-2	CLSI	585	93	15.9	72	12.3	19	3.2	2	0.3
		EUCAST	193	19	9.8	1	0.5	3	1.6	15	7.8
CCSRC14	CMY-2	CLSI	582	38	6.5	27	4.6	8	1.4	3	0.5
		EUCAST	194	14	7.2	6	3.1	6	3.1	2	1.0
Total		CLSI	8,028	951	11.8	522	6.5	374	4.7	55	0.7
		EUCAST	2,661	282	10.6	88	3.3	115	4.3	79	3.0
		10,689	1233	11.5	610	5.7	489	4.6	134	1.3	

^a AST susceptibility testing determinations with each criteria. ^bTotal errors including all antibiotics tested. ^cmE, ME and VME percentages were calculated with the number of determinations for each strain as the denominator.

Figure 1. Resistance mechanisms inferred by participating laboratories. A) Control strains; B) Wild type ESB-CTX-M- harboring strains; C) CTX-M variants with reduced susceptibility to BLBLIs. Others resistance mechanisms: (a) TEM-1/2, OXA-1/IRT, TEM hiperexpresion, porins alteration; (b) Chromosomal AmpC/TEM hiperexpresion. In CTX-M variant-harboring strains, centers reported ESB phenotype despite showing BLBLIs resistance.

